

Amanda Firmino

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DA *ALUYHG* E *INDEL14PB* DO GENE *HLA-G*  
EM PACIENTES COM PSORÍASE DO ESTADO DE SANTA CATARINA**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Ciências Biológicas” e aprovado em sua forma final com nota 10,0 pelo Curso de Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Yara Costa Netto Muniz  
Coorientadora: Dra. Ilíada Rainha de Souza

Florianópolis, Dezembro de 2012.

FIRMINO, A.

Estudo de associação da *Alu**y**HG* e *InDel14pb* em pacientes com psoríase do estado de Santa Catarina  
Florianópolis, SC, 2012.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas)

61p.

1. *Alu*; 2. *HLA-G*. 3. Caso-controle; 4. Imunogenética.

Amanda Firmino

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DA *ALUYHG* E *INDEL14PB* DO GENE *HLA-G*  
EM PACIENTES COM PSORÍASE DO ESTADO DE SANTA CATARINA**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Ciências Biológicas” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas.

Nota final: 10,0.

Florianópolis, 07 de Dezembro de 2012

---

Profa. Maria Risoleta Freire Marques  
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

**Banca Examinadora:**

Dra. Yara Costa Netto Muniz, Orientadora,  
Universidade Federal de Santa Catarina

Dra. Ilíada Rainha de Souza, Coorientadora,  
Universidade Federal de Santa Catarina

Biomédica Bibiana Sgorla de Almeida,  
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Erick da Cruz Castelli,  
Universidade Federal de Goiás

Dra. Andrea Rita Marrero,  
Universidade Federal de Santa Catarina



Este trabalho é dedicado aos meus  
amados pais, às minhas irmãs e aos  
meus amigos.

## AGRADECIMENTOS

Desejo agradecer a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Ilíada Rainha de Souza, que me acolheu no seu laboratório, me dando todo o apoio, tanto no âmbito profissional, como no pessoal, tenho certeza que és como uma segunda mãe para a maioria de seus orientados. MUITO OBRIGADA!

À minha orientadora Dra. Yara Costa Netto Muniz, pela ajuda indispensável, por todos os ensinamentos de bancada, de técnicas, dicas simples que fizeram toda a diferença e facilitaram o trabalho de todos os membros do laboratório. Mas, principalmente, pelo jeito meigo, carismático e alegre de tratar as coisas, inclusive os problemas encontrados. Isso contribui muito para o crescimento profissional e para a harmonia no nosso ambiente de trabalho. És o exemplo que pretendo seguir. SUPER OBRIGADA!

A todos os voluntários que aceitaram participar deste estudo, em especial aos pacientes do Ambulatório de Dermatologia/Psoríase do Hospital Nereu Ramos.

Ao Dr. Daniel Holthausen Nunes, à Dra. Vanessa Martins e à Dra. Mariana Mazzochi Sens pelo auxílio no contato com os pacientes e pelo empenho para que esses aceitassem participar deste estudo.

Às funcionárias do Ambulatório do Hospital Nereu Ramos, pelo auxílio nas coletas das amostras dos pacientes.

Aos meus colegas de LAPOGE, em especial Leili Hausmann e Gabriela Karasiak, minhas companheiras de laboratório, colegas de graduação e irmãs de consideração, vocês fizeram toda a diferença nestes quatro anos e meio e, tenho certeza que, continuarão fazendo por toda a minha vida. À Bibiana Sgorla de Almeida por me apresentar e me incluir no seu trabalho com a doença psoríase, sempre se dispondo a me ajudar e ensinar o que eu precisasse. A xuxulita Mariáh Damiani, por seu apoio, seu incomparável bom humor em todos os momentos e pelas hospedagens, sempre com muito carinho, em Blumenau nos tão esperados outubros! À Dra. Andrea Rita Marrero por todo o apoio intelectual, pessoal e gastronômico! Seus bolos são ótimos, principalmente o com decoração de joaninhas que fizestes no meu aniversário! MUITO OBRIGADA!

Aos meus pais, incríveis e indescritíveis, por todo o apoio sentimental, moral e psicológico. Não deve ter sido fácil aturar meu humor nos dias mais complicados destes últimos anos, mas vocês

sempre o fizeram muito bem, com muita calma e amor. Amo e admiro vocês de uma forma impossível de expressar com palavras. O meu mais sincero obrigada.

“A Terra girou para nos aproximar, girou ao redor de si mesma e dentro de nós, até que finalmente nos uniu neste sonho.”

Eugenio Montejo

À minha família, em especial minhas irmãs, nas quais me espelhei sempre, tanto pessoalmente, quanto profissionalmente. À tia Zazá e ao tio Gauchão por serem a minha casa em Porto Alegre, hospedando a mim e as minhas colegas durante os infindáveis congressos e cursos, sempre com muito amor e acolhimento. Vocês são meus segundos pais!

Aos meus amigos de infância e adolescência, Léo Posick, Lizi, Leila e as condinhas: Ana Paula, Bruh, Paola, Juh e Bruninha, muito obrigada por suportar os meus longos períodos de sumiços e continuarem sendo esses amigos incríveis, divertidos e sinceros, fazendo meus problemas sumirem em segundos quando junto de vocês.

Aos meus amigos e companheiros nesta jornada acadêmica, Leili, Mille, Gabi, May, Rafi, Che, Laís e Bidu por todo o apoio, principalmente pelos momentos de aliviar o *stress* nos nossos encontros, jantas, festas, bar da Nina, Meu Escritório e afins. Agradeço todos os dias por ter “caído” nessa turma tão especial, estarão sempre comigo, não interessa pra onde nossos caminhos nos levem a partir de agora. MUITO OBRIGADA!

“A gente não faz amigos, reconhece-os.”

Vinícius de Moraes

“Não é o fim. Não é sequer o início do fim, mas é,  
talvez, o fim do começo.”

Winston Churchill



## RESUMO

FIRMINO, A. **Estudo de associação da *Alu*YHG e *InDel14pb* em pacientes com psoríase do estado de Santa Catarina.** 61p. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

A psoríase é uma doença sistêmica crônica, de caráter imunoinflamatório e não contagioso, que pode acometer a pele, as unhas e as articulações. No Brasil, estima-se que sua prevalência seja de 1,3%. O Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) é uma das regiões mais polimórficas do genoma humano, caracterizado por uma alta densidade de genes e, pelo menos a metade, tem funções no sistema imune, sendo que grande parte foi associado com mais de 100 patologias. Além disso, nele existe um forte desequilíbrio de ligação entre alelos de *locus* específicos e alguns genes. Para este trabalho foram escolhidos dois polimorfismos localizados em regiões do MHC: o polimorfismo do tipo *Alu*, *Alu*YHG; e o *InDel14pb* de um gene imunorregulador, *HLA-G*, que tem sido associado com o controle da produção de *HLA-G*, modulando a estabilidade do mRNA. A partir disso, o objetivo deste estudo foi genotipar os polimorfismos citados, em 100 pacientes e 100 controles (pareados por idade e gênero) e verificar a influência desses polimorfismos na patogênese da doença. Para isso, foi realizado um levantamento de dados epidemiológicos relacionados ao desenvolvimento e gravidade da doença (presença de sintomas de artrite psoriásica, história familiar para a psoríase e idade de manifestação dos primeiros sintomas da doença) e estes foram testados como fatores de risco. O DNA foi extraído de sangue total e a genotipagem feita por PCR e visualizada em gel de agarose 1%, no qual o polimorfismo *Alu*YHG foi identificado. O *InDel14pb* foi genotipado em um trabalho prévio do nosso grupo, através de PCR e visualização em PAGE 7% corado com nitrato de prata. Do total de pacientes, 57 eram mulheres, 44 indivíduos apresentaram casos na família, 43 manifestaram a doença antes dos 30 anos e 16 manifestaram artrite psoriásica. Foram realizados cálculos das frequências alélicas e genotípicas, análises de associações e a inferência de haplótipos. Após as análises foram encontradas associações, para aqueles que apresentaram sintomas antes dos 30 anos de idade o genótipo *Alu*YHG\**In*\**Del* (OR=0,418;  $p=0,040$ ), assim como o alelo \**Del* (OR=2,929;  $p=0,013$ ) e o genótipo \**Del*\**Del* (OR=4,398;  $p=0,009$ ) do

*InDel14pb* para pacientes que apresentam sintomas de artrite psoriásica. O teste de desequilíbrio de ligação entre os dois *loci* indicou que eles estão em LD. Assim, estudos de expressão da molécula devem ser feitos de forma a esclarecer melhor como se dá o controle da expressão da molécula com relação aos polimorfismos estudados. Além disso, a análise de haplótipos entre esse dois polimorfismos deve ser melhor explorada, pois indica que esta região deva ser melhor caracterizada em estudos caso-controle em diferentes populações. De modo que se possa identificar *loci* marcadores que levarão a diminuição do esforço e dos custos de genotipagem desta região em estudos de associação com doenças, como psoríase, e auxiliar no desenvolvimento de técnicas de diagnóstico.

**Palavras-chave:** *Alu*. *HLA-G*. Caso-controle. Imunogenética.

## ABSTRACT

FIRMINO, A. **Association study of *Alu*YHG and *InDel14pb* in patients with psoriasis in the state of Santa Catarina.** 61p. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

Psoriasis is a chronic systemic disease, with an immunoinflammatory character and not contagious, which can affect the skin, nails and joints. In Brazil, it is estimated that the prevalence of this pathology is 1.3%. The major histocompatibility complex (MHC) is one of the most polymorphic regions on the human genome, characterized by a high density of genes where at least half of them, has functions in the immune system, much of which was associated with more than 100 pathologies. Furthermore, MHC showed up in strong linkage disequilibrium between alleles of specific loci and some other genes. For this study, were chosen two polymorphisms in regions of the MHC: *Alu*, *Alu*YHG polymorphism; and the *InDel14pb* of an immunoregulatory gene, known as *HLA-G*, which has been associated with the control of *HLA-G* production by modulating the stability of mRNA. Therefore, the aim of this study were to infer the genotype of the polymorphisms, in 200 samples (100 cases and 100 controls matched for age/gender), and determine the influence of these polymorphisms in the pathogenesis of psoriasis. We conducted a survey of epidemiological data related to the development and severity of the disease such as the presence of symptoms of psoriatic arthritis; family history for psoriasis and age at onset of the first symptoms were tested for risk factors. The DNA samples were extracted from whole blood, and the genotyping was carried out by PCR, whereas visualization were made by 1% agarose gel to identify the *Alu*YHG polymorphism. The *InDel14pb* was genotyped in a previous work of our group by PCR and visualized in a 7% PAGE stained with silver nitrate. Of all patients, 57 were women, 44 individuals had cases in the family, 43 manifested the disease before age 30 and 16 expressed psoriatic arthritis. Calculations of allele and genotype frequencies were performed, as well as association analysis and haplotype inference. After the analyzes, results showed that associations were found for those who had symptoms before 30 years of age, relating the genotype *Alu*YHG\**In*\**Del* (OR = 0.418,  $p = 0.040$ ), as well as the \**Del* allele (OR = 2.929,  $p = 0.013$ ) and genotype \**Del*\**Del* (OR = 4.398,  $p = 0.009$ ) for the *InDel14pb*

patients presenting symptoms of psoriatic arthritis. Linkage disequilibrium test between the two *loci* indicated that they are in LD. Thus, molecule expression studies must be made in order to further clarify how these polymorphism could be related with the control of the molecule expression. The haplotype analysis between these two polymorphisms should also be explored, as it indicates that this region must be better characterized in case-control studies in different populations, so that they can identify *loci* markers that will lead to reduced genotyping effort and cost of this region in association studies with diseases such as psoriasis, and aid in the development of moderns diagnostic techniques.

**Keywords:** *Alu*. *HLA-G*. Case-control. Immunogenetics.

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Prevalência da psoríase em alguns países do mundo.....	15
<b>Tabela 2.</b> Potenciais efeitos de inserções <i>Alu</i> .....	21
<b>Tabela 3.</b> Classificação da amostra, de acordo com gênero e idade, entre pacientes com psoríase (casos) e indivíduos saudáveis (controles).....	35
<b>Tabela 4.</b> Classificação da amostra de pacientes, em valores absolutos, de acordo com a ocorrência de artrite psoriásica, idade de manifestação dos primeiros sintomas da doença e histórico familiar.....	35
<b>Tabela 5.</b> Frequências alélicas e genotípicas para casos e controles, cálculos de associação (OR) entre a presença dos polimorfismos e o desenvolvimento da psoríase, valores de intervalo de confiança (IC, 95%) e <i>p</i> .....	38
<b>Tabela 6.</b> Frequências alélicas e genotípicas para a população de casos, cálculos de associação (OR) entre a presença dos polimorfismos e a ocorrência de artrite psoriásica, valores de intervalo de confiança (IC, 95%) e <i>p</i> .....	39
<b>Tabela 7.</b> Frequências alélicas e genotípicas para a população de casos, cálculos de associação (OR) entre a presença dos polimorfismos e a idade de manifestação dos primeiros sintomas da psoríase, valores de intervalo de confiança (IC, 95%) e <i>p</i> .....	40
<b>Tabela 8.</b> Frequências alélicas e genotípicas para a população de casos, cálculos de associação (OR) entre a presença dos polimorfismos e o histórico familiar de psoríase, valores de intervalo de confiança (IC, 95%) e <i>p</i> .....	41
<b>Tabela 9.</b> Frequências haplotípicas e de combinações haplotípicas para o grupo de casos e controles.....	42

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> O MHC Humano.. .....	199
<b>Figura 2:</b> Mapa genômico de três inserções Alu polimórficas no bloco alfa da região do MHC de classe I. ....	23
<b>Figura 3:</b> O mRNA primário do gene HLA-G.....	23
<b>Figura 4:</b> Gel de agarose 1% com amostras amplificadas para AluyHG.. .....	32

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1 A PSORÍASE .....	13
1.2 IMUNOLOGIA NA PSORÍASE .....	16
1.3 COMPLEXO DE HISTOCOMPATIBILIDADE PRINCIPAL – MHC.....	17
1.4 MARCADORES GENÉTICOS .....	19
1.4.1 Inserções <i>Alu</i> .....	20
1.4.2 O gene <i>HLA-G</i> .....	23
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>26</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
4.1 ASPECTOS ÉTICOS .....	28
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA .....	28
4.3 PROCESSAMENTO DO MATERIALBIOLÓGICO .....	29
4.3.1 Extração do DNA genômico .....	29
4.3.2 Genotipagem do polimorfismo <i>Alu</i> <i>yHG</i> .....	30
4.3.3 Genotipagem do polimorfismo <i>InDel</i> da 3'UTR do <i>HLA-G</i> ...	32
4.4 TRATAMENTO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	32
4.4.1 Aderência ao Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i> .....	32
4.4.2 Estimativas das Frequências Alélicas e Genotípicas .....	33
4.4.3 Análises de Associação .....	33
4.4.4 Desequilíbrio de Ligação.....	34
4.4.5 Inferência de Haplótipos.....	34
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA .....	35
5.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	36
5.2.1 Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i> .....	36
5.2.2 Frequências Alélicas, Genotípicas e Análises de Associação ..	36
5.3 DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO .....	42
5.4 INFERÊNCIA DE HAPLÓTIPOS .....	42
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>45</b>
ANEXO A – Questionário pacientes com psoríase.....	51
ANEXO B – Questionário indivíduos-controles .....	53
ANEXO C – Termo de consentimento livre esclarecido .....	57

**ANEXO D – Termo de consentimento livre esclarecido indivíduos-  
controles ..... 59**



## 1 INTRODUÇÃO

Algumas doenças são classificadas como de etiologia complexa devido ao seu desenvolvimento e manifestação estarem relacionados a uma combinação de fatores genéticos e ambientais (BACK, 2007). Nas doenças classificadas dessa forma, a presença de um ou mais alelos considerados de risco não necessariamente resultará no estabelecimento do fenótipo alterado. No entanto, estes alelos podem fornecer ao portador uma susceptibilidade genética que, em combinação a um conjunto de fatores ambientais, tais como: idade, sexo, dieta, exposição hormonal, hábitos, entre outros, pode resultar no desenvolvimento dessas patologias (HEWAGAMA; RICHARDSON, 2009; MONTELEONE *et al.*, 2011; MAK; HUNDHAUSEN; NESTLE, 2009). Um bom exemplo de doença complexa é a psoríase, classificada também como autoimune por muitos pesquisadores (HUEBER; MCINNES, 2007; MAK; HUNDHAUSEN; NESTLE, 2009). No entanto, até o momento não foi identificado o antígeno-próprio ao qual o organismo responderia. Se a psoríase é de fato, uma doença autoimune, um componente epidérmico, talvez a queratina, deve ser o candidato mais provável a antígeno-próprio (GRIFFITHS; BARKER, 2007; MAK; HUNDHAUSEN; NESTLE, 2009).

### 1.1 A PSORÍASE

A psoríase é uma doença sistêmica crônica, de caráter imunoinflamatório e não contagioso, que pode acometer pele, unhas e articulações (SBD, 2009; GRIFFITHS; BARKER, 2007; STICHERLING, 2005). Essa patologia é caracterizada pelo surgimento de lesões róseas ou avermelhadas recobertas por placas que atingem, principalmente, cotovelos, joelhos e couro cabeludo (MAK; HUNDHAUSEN; NESTLE, 2009).

O tipo mais comum da doença é a psoríase vulgar (cerca de 90% dos casos), que se caracteriza por placas eritematoescamosas bem delimitadas em áreas de traumas constantes na pele das mãos, pés, cotovelos, joelhos, couro cabeludo e região sacra. As articulações podem ser afetadas em 5 a 42% dos casos causando a artrite psoriásica (APs) (GOLDENSTEIN-SCHAINBERG; FAVARATO; RANZA, 2012), que é caracterizada por dor, inflamação e deformidade articular em pacientes portadores ou não de psoríase cutânea (SBD, 2009; MAK;

HUNDHAUSEN; NESTLE, 2009; GONZÁLEZ; QUEIRO; BALLINA, 2012).

Estima-se que a prevalência da APs no mundo seja em torno de 0,02% a 0,25% (GOLDENSTEIN-SCHAINBERG; FAVARATO; RANZA, 2012). Em 75% dos casos, a psoríase cutânea precede a artrite, em 15% ocorre o inverso e em 10% os quadros, cutâneo e articular, são simultâneos (GOLDENSTEIN-SCHAINBERG; FAVARATO; RANZA, 2012).

A psoríase tem ocorrência universal acometendo igualmente homens e mulheres de todas as idades, com picos de incidência na segunda (entre 16 e 22 anos) e na quinta décadas de vida (entre 57 e 60 anos) (GRIFFITHS; BARKER, 2007; COHEN; BARON; ARCHER, 2012). O aparecimento dos primeiros sintomas da doença antes dos 15 anos está correlacionado com uma maior gravidade da doença (um maior percentual da superfície corpórea é comprometida) e com a presença de outros casos na família (SBD, 2009).

A prevalência dessa patologia pode variar de zero a 11,8% (Tabela 1) (RAYCHAUDHURI; FARBER, 2001), sendo mais comum em pessoas brancas, e muito rara ou ausente em algumas populações isoladas (GUDJONSSON; ELDER, 2007). No Brasil não existem muitos estudos sobre a sua prevalência, porém estima-se que seja em torno de 1,3% (RAYCHAUDHURI; FARBER, 2001). Por ser uma doença de etiologia complexa, seu desenvolvimento se deve a interações de fatores genéticos, étnicos, ambientais (DUFFIN; WOODCOCK; KRUEGER, 2010; JOBIM; JOBIM; SALIM, 2008; NOGRALES; DAVIDOVICI; KRUEGER, 2010). Somado a estes fatores, observações clínicas e científicas têm demonstrado que as respostas do sistema imune, tanto inata quanto adaptativa, são cruciais para a formação e manutenção das placas psoriásicas (GRIFFITHS; BARKER, 2007; SBD, 2009). Além disso, a psoríase é associada com uma variedade de outras patologias (HENSELER; CHRISTOPHERS, 1995) como a doença de Crohn, diabetes mellitus (tipo 2) (NEIMANN; SHIN; WANG, 2006), doenças cardiovasculares (GELFAND *et al.* 2006a), depressão (ESPOSITO *et al.*, 2006) e câncer (GELFAND *et al.* 2006b).

**Tabela 1.** Ocorrência da psoríase em alguns países do mundo.

<b>Local</b>	<b>Prevalência da psoríase (%)</b>
Kazach'ye (ártico da ex-URSS)	11,80
Alemanha	6,50
Irlanda	6,50
Ilhas Caribenhas	6,00
Malásia	4,00 -5,50
África do Sul	4,00 -5,00
Escócia	4,80
Noruega	4,80
Canadá	4,70
Estados Unidos da América	2,20 -4,60
Paraguai	4,20
Espanha	3,70
Quênia	3,50
Kuwait	3,10
México	3,00
Egito	3,00
Tanzânia	3,00
Uganda	2,80
Suécia	2,30
Antiga União Soviética	2,00
Venezuela	2,00
Índia	0,50 -1,50
China	0,20 -1,50
Brasil	1,30
Japão	0,29-1,18
Nicaragua	0,20 -0,90
Guatemala	0,70
Honduras	0,70
Nigéria	0,08-0,40
Angola	0,30
Mali	0,05

Referência: RAYCHAUDHURI; FARBER, 2001.

A patogênese da psoríase ainda não está muito bem estabelecida. No entanto tem-se sugerido que as células T têm um importante papel nesse processo, pois linfócitos T tipo-1 estão presentes em uma fase precoce da doença e há resposta positiva às terapias cujos alvos são células T (WOJAS-PELC; MARCINKIEWICZ, 2007). As características da psoríase, como a hiperproliferação de queratinócitos, inflamação e angioneogênese, refletem a interligação patológica entre os queratinócitos e as células imunes (ALBANESI *et al.*, 2005). Nas lesões psoriásicas dos pacientes é observado um aumento do número de células

T e de células dendríticas, enquanto que a presença de neutrófilos nessas lesões é variável (WETZEL *et al.*, 2006; MCGREGOR *et al.*, 1992). Essas células imunes juntamente com os queratinócitos contribuem para o desenvolvimento da inflamação crônica da pele através da produção de citocinas (ALBANESI *et al.*, 2005).

## 1.2 IMUNOLOGIA NA PSORÍASE

A pele é o maior órgão do corpo e é descrita como a primeira barreira de órgãos linfoides, devido à presença de uma resposta imune eficaz conduzida dentro das suas camadas em conjunto com os linfonodos periféricos e linfócitos T circulantes. Como tecido linfoide associado à pele temos células apresentadoras de antígenos (APCs), células T epidermotrópicas e linfonodos de drenagem. Outras células que participam na resposta imune a este nível incluem os mastócitos, macrófagos, granulócitos, fibroblastos e células dendríticas, que interagem uns com os outros através da síntese de diferentes citocinas e mediadores químicos (GALADARI; SHARIF; GALADARI, 2005; COIMBRA *et al.*, 2012).

Embora esta resposta imune seja um fenômeno de proteção destinado à remoção de antígenos, tais mecanismos mediados por células algumas vezes passam a atacar auto antígenos, constituindo uma forma alterada de resposta imune, fato este que pode resultar em inflamações crônicas do tecido e estados patológicos como a psoríase, artrite reumatoide, doença de Crohn, sarcoidose e esclerose múltipla (GALADARI; SHARIF; GALADARI, 2005).

A psoríase foi inicialmente considerada uma doença ocasionada pela proliferação anormal dos queratinócitos e caracterizada por placas psoriásicas eritematosas. Acreditava-se que essas placas eram causadas pela hiperproliferação de queratinócitos epidérmicos, paraqueratose, infiltração de leucócitos e angioneogênese. Mais tarde, as células T foram identificadas como importantes componentes na iniciação e manutenção da psoríase. Foi verificado que o infiltrado de células leucocitárias na psoríase é constituído predominantemente de células T e que este evento parece preceder hiperplasia epidérmica (COIMBRA *et al.*, 2012).

A hipótese inicial de que as alterações epidérmicas são suficientes para iniciar as lesões de pele na psoríase e, portanto, que os queratinócitos são cruciais no desencadeamento dessa patologia ainda é aceita, no entanto, cada vez mais a importância das células T é reconhecida. No entanto, a atuação de outras células, tais como células

endoteliais, dendríticas, monócitos, neutrófilos, queratinócitos, bem como a atuação de quimiocinas e citocina parece desempenhar um papel importante em diferentes fases na patogênese da doença (GALADARI; SHARIF; GALADARI, 2005; COIMBRA *et al.*, 2012).

As células dendríticas são capazes de ativar as células T. Na psoríase, as células dendríticas imaturas reconhecem e capturam um antígeno ainda não identificado, migram para os linfonodos e estimulam as células T, apresentando-lhes o antígeno. Após esta estimulação, linfócitos T entram no sistema circulatório, migram para o local da inflamação e se acumulam em torno dos vasos sanguíneos. Este infiltrado de linfócitos contém predominantemente células T CD4+, mas também CD8+. Células T intraepidermais também parecem desempenhar um importante papel nas mudanças epidermais na psoríase (COIMBRA *et al.*, 2012).

A psoríase é considerada uma doença T-helper1 (Th1), pois um aumento das vias de citocinas Th1 (interferon  $\gamma$  [IFN- $\gamma$ ], fator de necrose tumoral- $\alpha$  [TNF- $\alpha$ ], interleucina-2 [IL-2], e IL-12) é observado nas placas psoriásicas (COIMBRA *et al.*, 2012).

Apesar da patologia deste estudo, como dito anteriormente, ter a presença de linfócitos T na formação da resposta inflamatória cutânea e de terapias que têm as células T como alvo responderem positivamente, ainda não foram identificados os autoantígenos aos quais a resposta inflamatória é direcionada (GRIFFITHS; BARKER, 2007; GUDJONSSON; ELDER, 2007; MAK; HUNDHAUSEN; NESTLE, 2009).

### 1.3 COMPLEXO DE HISTOCOMPATIBILIDADE PRINCIPAL – MHC

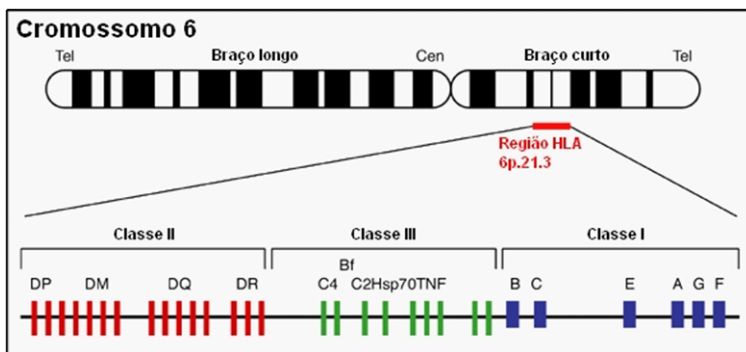
As células, anteriormente descritas, que participam da patogênese da psoríase, possuem receptores de membrana específicos que interagem com as moléculas do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*). Essas interações resultam na ativação ou na inibição da atividade de células da resposta imune.

Esse tipo de interação foi observada há mais de um século, quando transplantes de tecidos (aloeixertos) de ratos eram rejeitados quando transferidos para um animal diferente. Em 1937, Gorer mostrou que o chamado “H” ou antígeno de histocompatibilidade presente na superfície de células de ratos era responsável por este acontecimento. Sete anos mais tarde, Snell observou, em camundongos, que estes

antígenos eram controlados por genes do complexo “H-2”, no cromossomo 17, e nomeou esse *locus* multigênico como Complexo Principal de Histocompatibilidade (RELLE; SCHWARTING, 2012).

Esses antígenos são glicoproteínas cuja função ligar-se a fragmentos de peptídeos e apresentá-los na superfície celular. Os peptídeos apresentados através do MHC podem ser provenientes de duas origens: (1) intracelular, os peptídeos são resultado da síntese celular, ligam-se às moléculas MHC de Classe I e são apresentados na superfície de células T CD8+; ou (2) exógena, os fragmentos de peptídeos são resultantes de uma atividade proteolítica, ligam-se às moléculas MHC de classe II e são apresentados na superfície de células T CD4+. Esses diferentes tipos de MHC participam, portanto, tanto da apresentação de antígenos externos quanto de antígenos próprios (CHAPLIN, 2010; NEEFJES *et al.*, 2011).

Em humanos, o MHC foi nomeado de Antígeno Leucocitário Humano (HLA, do inglês *Human Leucocyte Antigen*) por essas moléculas serem expressas pelos leucócitos e não pelos eritrócitos. Compreende uma região genômica de aproximadamente 3,6 megabases, localizada no braço curto do cromossomo 6 (6p.21.3) (DUNN *et al.*, 2005; RELLE; SCHWARTING, 2012). O MHC é uma das regiões mais polimórficas do genoma humano. Também é caracterizado por sua alta densidade de genes, sendo que pelo menos a metade tem funções no sistema imune e, grande parte, foi associada com mais de 100 patologias (KULSKY *et al.*, 2002). O complexo consiste de aproximadamente 224 genes ligados, mais os elementos de repetição, e pode ser dividido em três sub-regiões: classes I, II e III (Figura 1) (DUNN *et al.*, 2005).



**Figura 1:** O MHC Humano. A localização do MHC humano no cromossomo 6, identificando as três regiões e a disposição dos genes dentro das classes II, III e I (adaptado de Cambridge Journals, 2012).

A região MHC de classe I é constituída por pseudogenes (*HLA-H*, *HLA-J*, *HLA-K* e *HLA-L*) e por genes codificadores para dois grupos de moléculas HLA: (1) as clássicas ou Ia, moléculas altamente polimórficas, onde se incluem as moléculas HLA-A, HLA-B e HLA-C; e (2) as não clássicas ou Ib, moléculas com um polimorfismo limitado, mais conservadas, onde estão incluídas as moléculas HLA-E, HLA-F e HLA-G. A região MHC de classe II possui genes que codificam moléculas expressas somente na superfície de APCs, enquanto que, a região MHC de classe III possui genes que codificam moléculas com outras funções imunes como os componentes do complemento e citocinas (CAROSELLA *et al.*, 2008; CASTELLI *et al.*, 2009).

#### 1.4 MARCADORES GENÉTICOS

A diversidade e a evolução do genoma humano são de grande interesse científico no cenário genômico atual. Estima-se que 99,9% do DNA é idêntico entre os seres humanos então, apenas 0,1% do DNA, o que corresponde a cerca de três milhões de nucleotídeos, pode contribuir para as diferenças entre indivíduos dentro da mesma população e entre populações distintas (KULSKY; DUNN, 2005).

A detecção dessa variabilidade genética é importante nas áreas da saúde, forense, estudos de populações, e é feita através de marcadores genéticos que podem ser um gene, um sítio de restrição ou qualquer sequência do DNA que apresente mais de uma forma alélica para o locus desejado. Alguns métodos são amplamente adotados, e utilizam

diferentes tipos de marcadores, tais como: microssatélites, polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP, do inglês *single nucleotide polymorphism*), inserções/deleções (indel), inserções *Alu*, entre outros (KULSKY; DUNN, 2005).

#### 1.4.1 Inserções *Alu*

A família de elementos repetitivos *Alu* foi originalmente identificada como uma fração de DNA repetitivo que era clivado pela enzima de restrição *AluI*, motivo do seu nome (HOUCK; RINEHART; SCHMID, 1979).

Inserções *Alu* são a classe mais abundante de elementos repetitivos móveis curtos (SINEs – do inglês *Short Interspersed Elements*) do genoma humano. Estima-se que pelo menos a metade do genoma humano seja composto por elementos repetitivos e que as inserções do tipo *Alu* contribuam aproximadamente com 10% do conteúdo genômico total (HOUCK; RINEHART; SCHMID, 1979; DUNN *et al.* 2007; KULSKY *et al.*, 2001). São sequências com cerca de 300pb de comprimento, derivadas do RNA ribossômico 7SL (BATZER, 1996; DUNN ET AL. 2007; KULSKY; DUNN, 2005).

Estes SINEs são inseridos no DNA cromossômico em locais diferentes por retrotransposição. Nesse processo, um DNA complementar é gerado através da transcrição reversa de um transcrito de RNA de uma sequência *Alu* mestre e é, então, inserido numa nova posição no genoma (DUNN *et al.* 2007; ROWOLD; HERRERA, 2000). Consequentemente, inserções *Alu* afetam a composição e a organização do genoma e, assim, podem influenciar na expressão de genes (Tabela 2) (ROWOLD; HERRERA, 2000; BRITTEN, 1997; NOVICK *et al.*, 1996). Estes elementos podem estimular a transcrição de *loci* adjacentes, quando possuem promotores ou características potencializadoras em sua sequência (BRITTEN, 1997). Por outro lado, inserções *Alu* também podem diminuir a atividade transcricional de regiões adjacentes, promovendo a formação de nucleossomos nestes pontos (ENGLANDER; HOWARD, 1995). Outra forma de controle exercido pelas *Alu* está na sua capacidade de induzir a metilação em loci próximos, com efeito inibitório ou potencializador da transcrição (ROWOLD; HERRERA, 2000).



**Tabela 2.** Efeitos potenciais de inserções *Alu*.

<b>Inserção</b>	<b>Efeitos potenciais sobre a organização e função do gene</b>
<b>Em promotores</b>	RNA polimerase não reconhece a sequência promotora, conduz a falha de transcrição.
<b>Entre promotores</b>	A distância entre os promotores é modificada e suas funções alteradas ou bloqueadas, evitando o início da transcrição.
<b>Em potencializadores</b>	A ação dos potencializadores sobre os promotores é alterada, afeta os níveis de transcrição.
<b>Em exons</b>	Um novo produto é produzido, com função similar ou distinta. Rearranjos são promovidos levando a adição/remoção e mutações no quadro de leitura. Um local oculto de <i>splicing</i> é ativado criando um novo produto gênico. O elemento <i>Alu</i> é removido.
<b>Em introns</b>	O local de <i>splicing</i> é modificado gerando um novo produto gênico com função similar ou distinta. O elemento <i>Alu</i> é removido por <i>splicing</i> .
<b>Em domínios de heterocromatina</b>	Novos elementos <i>Alu</i> tendem a formar <i>clusters</i> na área, afetando a expressão de genes próximos.

Adaptado de NOVICK *et al.*, 1996.

Elementos *Alu* contidos dentro de *introns*, bem como em regiões 5'e 3' não traduzidas (URR e UTR) podem afetar o processamento do mRNA imaturo, o que gera produtos de genes alterados. Este fenômeno ocorre devido à alteração do local de *splicing*, ou do próprio mecanismo de *splicing*. Estas alterações, que muitas vezes resultam em graves doenças genéticas, são causadas por quaisquer mutações pontuais em inserções *Alu* preexistentes ou por eventos de retrotransposição *de novo* (ROWOLD; HERRERA, 2000). A presença de *Alu* em *exons* também pode ter efeitos graves sobre a expressão gênica por desencadear a produção de proteínas truncadas, interrompendo os quadros normais de leitura aberta (ORFs, do inglês *Open Read Frame*) (ROWOLD; HERRERA, 2000).

Novick *et al.* (1996) compilou uma série de estudos que relacionam os elementos *Alu* a diversas patologias como: (1) hemofilia, causada pela inserção de um membro da família *AluHS* no locus V do gene IX do fator de coagulação sanguínea, o que resulta num *stop codon* prematuro que gera um fator IX não funcional; (2) meningioma, cujo desenvolvimento está associado com a deleção de um elemento *Alu* no quinto *intron* do gene *c-sis*, do cromossomo 22; (3) angiodema

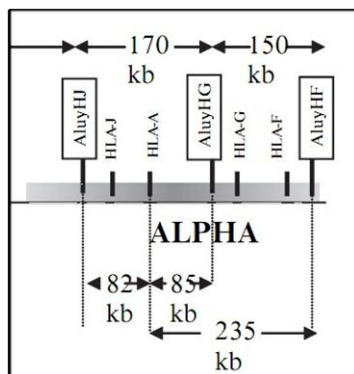
hereditário, causado pela deficiência de um inibidor chamado *CI* (*CI INH*) devido a deleções parciais resultantes de recombinação *Alu-Alu* por *crossing-over* desigual no interior do gene *CI*; (4) bem como hipercolesterolemia familiar, (5) atrofia girata da coróide e retina, (6) neurofibromatose tipo 1 e (7) trombastenia de Glanzmann (TG). No entanto, embora inserções ou deleções *Alu* em genes específicos tenham sido relacionados com as doenças acima citadas, existem outros tipos de mutações que podem causar tais patologias, como substituições de base (NOVICK *et al.*, 1996).

Os elementos de inserção *Alu* têm uma ampla gama de aplicações, incluindo mapeamento do genoma, diagnóstico clínico, identificação cromossômica e a caracterização de rearranjos genômicos. Além disso, os polimorfismos *Alu* são usados para identificar a diversidade genética humana em vários níveis, podendo ser empregados em estudos de ancestralidade e forense. Devido à sua distribuição onipresente no genoma humano, as repetições *Alu* servem como eficazes marcadores genéticos (ROWOLD; HERRERA, 2000).

Dentre as inserções *Alu*, os membros da subfamília *AluY* são candidatos potencialmente úteis para investigar as origens dos haplótipos ancestrais humanos, grupos étnicos e associações com doenças. Eles surgiram pela primeira vez na história dos primatas há cerca de 19 milhões de anos atrás, com cerca de seis subfamílias *AluY* agora descritas no genoma humano (BATZER *et al.*, 1996). A *AluYb8*, uma destas subfamílias, parece ser exclusivo de humanos e tem sido associado com diferentes doenças genéticas humanas (DEININGER; BATZER, 1999). Existe uma variação de 500 a 1500 membros da subfamília *AluYb8* distribuídas no genoma humano (ZIETKIEWICZ *et al.*, 1994). Devido ao seu polimorfismo, têm sido utilizados em estudos populacionais para diferenciar grupos étnicos e traçar os padrões de migração dos humanos modernos. No entanto, há pouca informação disponível sobre as relações evolutivas entre os membros polimórficos da subfamília *AluYb8* e os chamados haplótipos humanos fundadores (KULSKY *et al.*, 2001).

O bloco alfa, dentro do MHC, é um exemplo dos seis blocos que descrevem haplótipos fundadores em diferentes populações e grupos étnicos, assim como associações com doenças (DAWKINS *et al.*, 1999). O gene *HLA-A* evoluiu para uma das sequências mais polimórficas do bloco alfa, enquanto os genes *HLA-F* e *HLA-G*, estreitamente ligados, permaneceram bastante conservados. Durante comparações entre sequências genômicas de 319kb do bloco alfa (KULSKI *et al.*, 1999), foi identificado um membro novo da subfamília *AluYb8*, denominado

*Alu*<sub>YG</sub>, localizado entre os genes *HLA-A* e *HLA-G*, aproximadamente 88 kb do gene *HLA-A* (Figura 2).



**Figura 2:** Mapa genômico de três inserções *Alu* polimórficas no bloco alfa da região do MHC de classe I. As distâncias no mapa (kb) foram calculadas a partir das entradas no *GenBank* com os códigos e acesso AP000503 a AP000521. Adaptado de KULSKY *et al.*, 2005.

#### 1.4.2 O gene *HLA-G*

A molécula *HLA-G* (classe I, não clássica), difere das moléculas classificadas como clássicas em diversidade genética, expressão, estrutura e função. A estrutura gênica do *HLA-G* consiste em 4396pb, divididos em sete *introns* e oito *exons*, sendo que o *exon 7* é ausente no RNA mensageiro maduro (mRNA), devido a sua remoção durante o *splicing*, e o *exon 8* não é traduzido sendo, portanto, considerado a região 3' não traduzida (UTR, do inglês *Untranslated Region*). O *codon* de parada está localizado no *exon 6* (Figura 3) (CASTELLI *et al.*, 2011; DONADI *et al.*, 2011; MOREAU *et al.*, 2009; LARSEN; HVIID, 2009).



**Figura 3:** O mRNA primário do gene *HLA-G*. A estrutura molecular do mRNA primário do *HLA-G*, na qual estão identificados os oito *exons* (E1-8), o *codon* de parada no *exon 6* (E6) e dois *introns*, i2 e i4 (adaptado de CAROSELLA *et al.*, 2008).

Em condições não patológicas a expressão do *HLA-G* é restrita a alguns tecidos, sendo expresso predominantemente na interface materno- fetal, onde assume um papel crucial na implantação e na manutenção da imunotolerância materno-fetal durante a gravidez. Sua expressão também é encontrada no timo, córnea, pâncreas, matriz das unhas e em células tronco hematopoiéticas. Em condições patológicas a expressão deste gene é observada em vários tumores, infecções virais, doenças inflamatórias e autoimunes (CASTELLI *et al.*, 2011; MOREAU *et al.*, 2009).

A *HLA-G* tem a capacidade de atuar, diretamente, na atividade das células participantes da resposta imune. Inclusive, sua ação tem sido observada na aceitação de órgãos transplantados e no escape imunológico de tumores e células infectadas por vírus (CAROSELLA *et al.*, 2008; CASTELLI *et al.*, 2011; LARSEN; HVIID, 2009; MOREAU *et al.*, 2009).

Quando comparado com os genes *HLA* de Classe I clássicos, que possuem centenas de alelos, o *locus HLA-G* é considerado pouco polimórfico, com 50 alelos descritos (*The International Immunogenetics Database - IMGT/HLA, database version 3.10.0*, outubro 2012). No entanto, as regiões 5' reguladora e 3' não traduzida possuem um grau relativamente alto de variações nucleotídicas (DONADI *et al.*, 2011; NÜCKEL *et al.*, 2012).

Na região promotora do *HLA-G* foram identificadas, até 2011, 29 variações, sendo 27 SNPs e duas inserções/deleções (InDel) (NÜCKEL *et al.*, 2012; CASTELLI *et al.*, 2011). Essas variações podem estar implicadas, diretamente, na regulação da expressão desse gene, uma vez que, muitos desses polimorfismos estão dentro ou próximos de conhecidos ou supostos elementos reguladores da transcrição (NÜCKEL *et al.*, 2012; MOREAU *et al.*, 2009).

A região 3'UTR, por outro lado, possui oito sítios polimórficos descritos: um polimorfismo InDel de um fragmento de 14pb (*14pb InDel*) e sete SNPs (+3003 T/C, +3010 C/G, +3027 A/C, +3035 C/T, +3142 G/C, +3187 A/G e +3196 G/C). O polimorfismo *InDel14pb*, a presença de uma guanina na posição +3142 G/C e a presença de uma adenina na posição +3187 A/G foram associados à regulação dos níveis de expressão do *HLA-G* (LARSEN; HVIID, 2009; MOREAU *et al.*, 2009).

Embora o polimorfismo *InDel14pb* ter sido associado com o controle da produção de *HLA-G*, modulando a estabilidade do mRNA, os mecanismos que estão envolvidos nesse processo ainda não estão bem elucidados. A presença da inserção de 14pb (5'-

ATTTGTTTCATGCCT-3') foi associada, em células de trofoblastos, com uma produção mais baixa dessa molécula, tanto para as isoformas solúveis, como para as isoformas ligadas à membrana. Por outro lado, uma fração dos mRNAs que apresentam a inserção de 14pb pode ser adicionalmente processada, por *splicing* alternativo, ocorrendo a remoção de 92 bases do RNAm maduro. Esse processo resulta em transcritos de HLA-G menores, os quais têm sido relatados como formas mais estáveis da molécula do que os mRNAs completos (DONADI *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, o *HLA-G* tem sido estudado buscando elucidar os mecanismos da patogênese da psoríase. Foi observada a presença de HLA-G na pele de portadores dessa patologia, enquanto que, até o momento, essa molécula não foi descrita na pele de pessoas saudáveis (CARDILI *et al.*, 2010; UROSEVIC, 2007). Nos pacientes com psoríase, as principais células que expressam o *HLA-G* são os macrófagos que revestem as junções dermoepidérmicas. Essa distribuição das células que expressam *HLA-G* está de acordo com a atual visão da patogênese da psoríase, na qual os queratinócitos produzem determinados tipos de citocinas e quimiocinas, alguns dos quais são capazes de provocar o aumento da expressão do *HLA-G*. Estes achados levam à suposição de que os macrófagos que expressam *HLA-G* podem representar um sistema de controle interno para neutralizar células T autorreativas que expressam receptores cognatos para *HLA-G* (UROSEVIC, 2007).

No presente estudo, foi analisada a relação entre *AluYHG* e o *locus* vizinho *HLA-G* através da frequência de associação entre o polimorfismo *AluYHG* e o polimorfismo *InDel14pb* do gene *HLA-G* em pacientes com psoríase e indivíduos controles no estado de Santa Catarina.

## 2 JUSTIFICATIVA

A psoríase é uma doença inflamatória crônica, imuno mediada. Sua prevalência no Brasil é estimada em cerca de 1,3%, mas pode superar 6% em países como a Alemanha e Irlanda (RAYCHAUDHURI; FARBER, 2001). Essa patologia pode ter um impacto significativo na qualidade de vida do paciente e está associada à diminuição da produtividade, depressão e a um aumento na prevalência de doenças neoplásicas (SBD, 2009). Embora a maioria dos autores descrevam a psoríase como autoimune, ainda pouco se sabe sobre a patogênese dessa doença e nenhum autoantígeno responsável pela reação do sistema imune contra o próprio foi encontrado até o momento. Além disso, há poucos estudos de associação entre genes do sistema imune, como os da região do MHC e esta patologia.

Como o MHC é uma das regiões mais polimórficas do genoma humano, caracterizado por uma alta densidade de genes e, pelo menos a metade, tem funções no sistema imune, sendo que grande parte foi associado com mais de 100 patologias (KULSKY *et al.*, 2002). Além disso, existe um forte desequilíbrio de ligação entre alelos de *locus* específicos dessa região e alguns genes (DUNN *et al.*, 2005).

Desta forma, para este trabalho foi escolhido um gene imunorregulador, *HLA-G*, (DONADI *et al.*, 2011) e um polimorfismo do tipo *Alu*, *Alu<sub>YHG</sub>*, em região intergênica entre o *HLA-A* e o *HLA-G*. Assim, através dos dados obtidos nesse trabalho, um padrão de desequilíbrio de ligação pode ser estabelecido.

Compreender a relação dessa região com essa patologia pode ajudar a esclarecer as relações entre elas. Além de gerar dados que poderão ser usados para identificação de marcadores desta região, auxiliando assim, em melhoras no diagnóstico.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Genotipar o polimorfismo *Alu*yHG (situado no MHC humano entre os genes *HLA-A* e *HLA-G*) em pacientes com psoríase e indivíduos-controles, do estado de Santa Catarina, relacionando-a com polimorfismos da 3'UTR do gene *HLA-G* e desta forma descrever o padrão de desequilíbrio de ligação desta região, auxiliando assim em um melhor entendimento da patogênese da doença.]

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Genotipar e calcular a frequência alélica e genotípicas da inserção *Alu*yHG em pacientes com psoríase e em indivíduos-controles.
- ❖ Inferir os haplótipos *Alu*yHG e polimorfismos da 3'UTR do gene *HLA-G* (dados disponíveis no laboratório).
- ❖ Verificar se há associação entre os alelos, genótipos, haplótipos, dados clínicos e epidemiológicos e a doença estudada.
- ❖ Relacionar os dados encontrados neste estudo com a patogênese da psoríase.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho é parte de um projeto maior em vigência, intitulado “Estudo genético e epidemiológico em pacientes com psoríase no estado de Santa Catarina”, coordenado pela Dra. Ilíada Rainha de Souza e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH/UFSC) em 25/10/10, através do parecer nº 1034/12.

### 4.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi constituída de 200 indivíduos voluntários. Desses, 100 pacientes diagnosticados com psoríase, atendidos pelo Ambulatório de Dermatologia/Psoríase do Hospital Nereu Ramos e do Hospital Universitário (HU) vinculado à UFSC, no período de dezembro de 2010 a novembro de 2011, e 100 indivíduos-controles, pessoas sem diagnóstico de doença prévia nem histórico familiar para a patologia em estudo, que são participantes de projetos realizados paralelamente pela equipe do Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE/UFSC). As amostras de casos e controles foram pareadas por idade e gênero dos indivíduos.

Os dados epidemiológicos e familiares, dos pacientes e dos indivíduos-controles, foram obtidos em questionários estruturados (Anexos A e B) e que foram aplicados após a assinatura dos termos de consentimento livre e esclarecido (TCLE, Anexos C e D) pelos voluntários. As amostras de sangue periférico (cerca de 8 ml) para extração do DNA genômico e obtenção dos dados genéticos foram coletadas após as entrevistas.

As amostras biológicas e os questionários obtidos nessa pesquisa foram catalogados e constituem um banco de dados e de amostras, de pacientes com psoríase e de indivíduos-controles, armazenados no LAPOGE.

Dentre os dados obtidos através dos questionários, foram considerados nesse trabalho: sexo e idade, para ambos os grupos e, idade de manifestação da doença e a presença de sintomas articulares (artrite psoriásica) para o grupo de pacientes.



## 4.3 PROCESSAMENTO DO MATERIALBIOLÓGICO

### 4.3.1 Extração do DNA genômico

As amostras de sangue periférico foram coletadas com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) para a extração do material genético e análise dos polimorfismos no LAPOGE. As amostras biológicas foram centrifugadas (*Centrifuge 206 BL Excelsa II®*) a 3000xg (1835rpm) durante 15 min a temperatura ambiente (TA), os constituintes do sangue foram separados e a partir da camada de leucócitos foi obtido o DNA genômico. A extração de DNA foi realizada pelo método *Salting-out* adaptado de Miller *et al.* (1988).

#### **Reagentes e Soluções**

- 1) Solução de Lise I (Tris-HCl 0,01M; Sacarose 0,32M; MgCl<sub>2</sub> 0,0025M; Triton X 100 – 1%)
- 2) Solução de Lise II (Tris-HCl 0,01M; KCl 0,05M; MgCl<sub>2</sub> 0,0025M; IGEPAL – 1%; TWEEN 20 – 1%)
- 3) SDS (10%)
- 4) Solução de Perclorato de Sódio (5,0M)
- 5) Solução Saturada de NaCl (6,0M)
- 6) TE (Tris-HCl 1M; EDTA 0,5M)

#### **Procedimento**

Para cada amostra, foram colocados 100µL da camada de leucócitos em microtubos de polipropileno de 1,5mL (tipo *eppendorf*), utilizando-se uma micropipeta e ponteiras estéreis. Em seguida, foi adicionado 1,0mL Solução de Lise I em cada um desses microtubos. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 13400g durante 4 min. O sobrenadante foi descartado e este procedimento foi repetido (de 3 a 4 vezes) até que os glóbulos vermelhos fossem removidos e o precipitado apresentasse cor branca, indicando somente a presença dos glóbulos brancos. Posteriormente, foi acrescentado ao precipitado de leucócitos 300µL de Solução de Lise II, 10µL de SDS 10% e 75µL de Perclorato de Sódio 5M. As amostras foram agitadas em um agitador de tubos, do tipo vórtex, a cada tubo foi acrescentado 130µL de NaCl 6M e, a seguir, as amostras foram centrifugadas a 13400g por 5 min. Novos microtubos de 1,5mL foram identificados e, para esses, foram transferidos os sobrenadantes resultantes da centrifugação. Ao sobrenadante foram adicionados 300µL de Álcool Isopropílico e as amostras foram novamente centrifugadas a 13400g por 15 min. O

sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi acrescentado 300µL de Etanol 70%. As amostras foram centrifugadas a 13400g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco, a temperatura ambiente, *overnight*. Sobre os precipitados secos foram adicionados 200 µL de TE. As amostras foram colocadas no banho-maria a 56°C, por 30 min e, posteriormente, armazenadas a -20°C. Alíquotas de uso foram diluídas na concentração de 20µg/mL e também armazenadas a -20°C.

#### 4.3.2 Genotipagem do polimorfismo *AluyHG*

A genotipagem da presença ou ausência da sequência *AluyHG*, na região intergênica localizada entre os genes *HLA-H* e *HLA-G* foi realizada através da amplificação dessa região pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*).

#### Reação em Cadeia da Polimerase

##### *Reagentes e Soluções*

- 1) Água MiliQ®
- 2) dNTPs 0,2mM (de cada)
- 3) MgCl<sub>2</sub> 1,5mM
- 4) Tampão de PCR 1X (0,2M Tris-HCl pH 8,5; 0,5M KCl)
- 5) DMSO 98% (Dimetilsulfóxido)
- 6) *Primer Forward* 10pmol (*AluyHGF*, 5'-CAGGACAACCAGTAAAGATGCTGG-3')
- 7) *Primer Reverse* 10 pmol (*AluyHGR*, 5'-GCTTCAGTTAACATGCAAGTTTATGCC-3')
- 8) Taq DNA polymerase Platinum® (0,5U, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

##### *Procedimento*

Para a reação de amplificação foram adicionados, em microtubos de 0,6µL (tipo *ependorf*): 16,7µL de água; 0,50µL de dNTPs; 0,75µL de MgCl<sub>2</sub>; 2µL de Tampão de PCR; 1,25µL de DMSO; 0,30µL de Primer R; 0,30µL de Primer F; 0,20µL de *Taq Platinum* e 3µL de DNA (em torno de 200ng). Essas amostras foram colocadas em um termociclador e submetidas a uma desnaturação inicial a 94°C por 3 min e, em seguida, a 30 ciclos de: 94°C por 30s, 58°C por 30s e 72°C por 50s; seguido por um passo de extensão final a 72°C por 5 min (adaptado de KULSKI *et al.*, 2001).

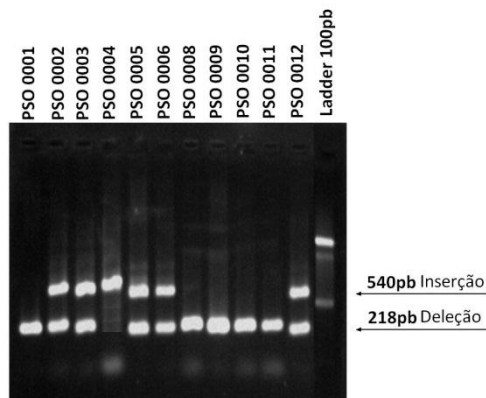
## **Análise do Produto Amplificado**

### ***Reagentes e Soluções***

- 1) Agarose
- 2) Tampão TBE 10X (Tris base 0,89M; Ácido Bórico 0,89M; EDTA 0,2M)
- 3) Tampão TBE 0,5X (50mL do Tampão TBE 10X; 950mL H<sub>2</sub>O)
- 4) Tampão de aplicação de amostras (900 µL de brofenol; 900 µL xilenocianol; 900 µL TBE; 4,5mL Ficoll 30% diluído em H<sub>2</sub>O; 1,8mL EDTA 0,5M pH 8,0; 3,6g sacarose)
- 5) Corante fluorescente GelRed® 10000X (1 µL de GelRed® 10000X; 500 µL H<sub>2</sub>O)
- 6) Padrão de Peso Molecular

### ***Procedimento***

Os produtos amplificados foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1%. O fragmento contendo a inserção *AluYHG* apresentou 540 pb e o fragmento com a ausência desta inserção 218. Estes géis foram feitos adicionando num frasco *Erlenmeyer*: 40mL de TBE 0,5X; 0,4g de agarose. A mistura foi levada à ebulição por aproximadamente 1min e, após isso, foi vertida na tina de eletroforese, onde o pente foi encaixado. Foi aguardada a gelificação do gel (cerca de 15min). As amostras foram preparadas da seguinte forma: 4 µL de produto de produto da PCR; 0,3µL de tampão de aplicação de amostras e 0,2µL de corante fluorescente *GelRed®* 10000X diluído 1:500; e esta mistura foi aplicada no gel. No último poço foi colocado o padrão de peso molecular para, posteriormente, ser comparado com as bandas amplificadas. A corrida foi realizada na cuba de eletroforese horizontal, durante 30min, e a fonte de eletroforese foi regulada de maneira que, a Voltagem (V) ficou fixa em 95 e, a Amperagem (mA) e a Potência (W) ficaram livres. O gel foi visualizado em luz ultravioleta (UV) e registrado em fotodocumentador (*DNR Bio-Imaging Systems MiniBISProÒ®*) e a leitura do gel feita pela identificação do tamanho dos fragmentos (Figura X).



**Figura 4:** Gel de agarose 1% com amostras amplificadas para AluYHG. A presença da inserção apresenta um fragmento de 540 pb e a ausência apresenta um fragmento de 218 pb. A amostra PSO0001 apresenta um genótipo del/del; a amostra PSO0002 in/del; e a amostra PSO0004 in/in.

#### 4.3.3 Genotipagem do polimorfismo *InDel* da 3'UTR do *HLA-G*

A genotipagem do polimorfismo *InDel14pb* (rs1704), da 3'UTR, foi realizada no LAPOGE como parte do trabalho de Almeida (2012), conforme protocolo de Castelli *et al.* (2010).

### 4.4 TRATAMENTO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

#### 4.4.1 Aderência ao Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*

Segundo o teorema de *Hardy-Weinberg*, as frequências genotípicas esperadas no equilíbrio podem ser estimadas a partir da expansão do seguinte binômio:

$$(x_i + x_j)^2 = x_i^2 + 2 x_i x_j + x_j^2$$

No qual:

$x_i$  é a frequência esperada dos homozigotos do alelo  $i$ ;

$2x_i x_j$  é a frequência esperada do heterozigoto  $ij$ ;

$x_j$  é a frequência esperada dos homozigotos para o alelo  $j$ .

A aderência das frequências genotípicas observadas às proporções teóricas de *Hardy-Weinberg* foi verificada utilizando o programa GENEPOP®, versão 3.4 (RAYMOND; ROUSSET, 1995).

No teste exato de probabilidade, o valor de  $p$  corresponde à soma de probabilidades de todas as tabelas com probabilidade menor ou igual ao observado.

### 3.4.2 Estimativas das Frequências Alélicas e Genotípicas

As frequências alélicas ( $x_i$ ) e genotípicas ( $X_{ii}$ ) de cada *locus*, em casos e controles, foram estimadas por contagem direta, com o uso do programa GENEPOP® (RAYMOND; ROUSSET, 1995) versão 3.4, de acordo com as seguintes equações:

$$x_i = \frac{2n_{ii} + \sum n_{ij}}{2n} \text{ e } X_{ii} = \frac{n_{ii}}{n}$$

Nas quais:

$x_i$  é a frequência do alelo “i”;

$X_{ii}$  é a frequência do genótipo “ii”;

$n_{ii}$  e  $n_{ij}$  correspondem ao número de homozigotos e heterozigotos observados para o alelo i, respectivamente;

$n$  corresponde ao número de indivíduos analisados.

### 4.4.3 Análises de Associação

A associação dos genótipos e haplótipos com a susceptibilidade à psoríase foi verificada com base em tabelas de contingência 2x2, para isso foi utilizado o cálculo de *Odds Ratio* (OR) ou razão de chances, foi adotado um Intervalo de Confiança (IC) de 95% e o  $p=0,05$  como o valor limite de significância (Woolf, 1955). A OR foi calculada por meio da seguinte equação:

$$OR = (ad)/(bc)$$

Na qual:

$a$  é o número de indivíduos que apresentam o fator de risco e o resultado de interesse;

$b$  é o número de indivíduos que apresentam o fator de risco, mas não o resultado de interesse;

$c$  é o número de indivíduos que não apresentam o fator de risco, mas apresentam o resultado de interesse;

$d$  é o número de indivíduos que não apresentam o fator de risco nem o resultado de interesse.

A OR é utilizada para representar o aumento das chances de determinado resultado ser devido à presença de um fator de risco. Para este cálculo foi utilizado o software *MedCalc*® (disponível em [http://www.medcalc.org/calc/odds\\_ratio.php](http://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php)).

#### 4.4.4 Desequilíbrio de Ligação

A análise de desequilíbrio de ligação (LD, do inglês *Linkage Disequilibrium*), associação não aleatória de alelos em diferentes *loci*, foi realizada utilizando-se o programa GENEPOP®, versão 3.4 (RAYMOND; ROUSSET, 1995). A hipótese nula é a de que a distribuição genotípica em um *locus* é independente da distribuição em outro *locus*.

#### 4.4.5 Inferência de Haplótipos

Para inferir os haplótipos formados pelos dois polimorfismos da região do MHC humano, (a inserção *Alu*yHG e *14pbInDel* da 3'UTR do gene *HLA-G*) foi utilizado o programa PHASE 2.1.1. Este programa utiliza algoritmo bayesiano e apresenta melhor desempenho que os outros algoritmos (STEPHENS; SMITH; DONNELLY, 2001; STEPHENS; SCHEET, 2005).

Para esta inferência, um banco de dados do LAPOGE contendo todos os indivíduos genotipados para os polimorfismos aqui analisados, incluindo amostras não utilizadas no presente trabalho, foi considerado. Isto porque o programa se baseia na frequência dos achados no banco disponibilizado, assim, quanto maior o banco melhor serão os resultados da inferência.

Somente os haplótipos cujo valor da inferência foi igual ou superior a 90% foram considerados, e neste caso restaram apenas os com valor igual a 100%, justificando assim a redução do tamanho amostral nas análises de haplótipos. A frequência dos haplótipos, assim como das combinações haplotípicas foi calculada por contagem.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Os 200 indivíduos que compõem a amostra deste estudo (100 pacientes e 100 indivíduos-controles) residem no estado de Santa Catarina e não são aparentados. Os dois grupos, pacientes e indivíduos-controles, foram pareados de acordo com o gênero e a classe etária, para a realização dos testes estatísticos (Tabela 3).

**Tabela 3.** Classificação da amostra, de acordo com gênero e idade, entre pacientes com psoríase (casos) e indivíduos saudáveis (controles).

Dados Epidemiológicos	Casos	Controles
	(n=100)	(n=100)
<b>Gênero</b>		
Feminino	57	57
Masculino	43	43
<b>Idade</b>	(n=100)	(n=100)
(MÉDIA ± SD)	45,6 ± 12,8	45,3 ± 12,82

n: número amostral; MÉDIA: média entre as amostras; SD: desvio padrão da média.

Os dados epidemiológicos considerados neste estudo como fatores de risco para o desenvolvimento e a gravidade da psoríase (presença de sintomas de artrite psoriásica, idade da manifestação dos primeiros sintomas da psoríase e histórico familiar para a doença) estão descritos na Tabela 4.

**Tabela 4.** Classificação da amostra de pacientes, em valores absolutos, de acordo com a ocorrência de artrite psoriásica, idade de manifestação dos primeiros sintomas da doença e histórico familiar.

Ocorrência de Artrite Psoriásica	Casos	Idade de manifestação	Casos	Histórico Familiar	Casos
Sim	16	≤ 30 anos	43	Presente	44
Não	84	> 30 anos	57	Ausente	56
Total	100	Total	100	Total	100

## 5.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A partir da análise, em pacientes e indivíduos-controles, de dois sítios polimórficos da região do bloco alfa do MHC, *AluyHG* entre os genes *HLA-A* e *HLA-GeInDel14pb* na região 3' não traduzida do *HLA-G*, foram realizadas as seguintes análises estatísticas: equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, frequências alélicas e genotípicas (para casos e controles e para presença ou ausência dos fatores de risco na população de casos), desequilíbrio de ligação, inferência de haplótipos e análises de associação. Os dados referentes ao *locus InDel14pb* foram obtidos a partir do trabalho de Almeida (2012).

### 5.2.1 Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*

As distribuições das frequências dos sítios polimorfismos analisados em casos e controles estavam de acordo com o equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, exceto o *locus AluyHG*, que apresentou desvio significativo na amostra de indivíduos-controles ( $p=0,0092$ ).

### 5.2.2 Frequências Alélicas, Genotípicas e Análises de Associação

Os resultados obtidos após os cálculos das frequências alélicas e genotípicas de casos e controles estão descritos na tabela 5. Os valores de OR não foram significativos, o que demonstra não haver relação direta entre a presença dos polimorfismos *AluyHG* e *InDel14pb* da 3'UTR do *HLA-G* e a ocorrência de psoríase nesta amostra. Considerando que ambos os polimorfismos estão em LD, estes dados estão de acordo com os resultados previamente encontrados para a mesma amostra (ALMEIDA, 2012), que não encontrou associação com nenhum dos oito polimorfismos da 3'UTR do *HLA-G* analisado.

Os resultados obtidos após os cálculos das frequências alélicas e genotípicas, na população de casos, para a presença ou ausência dos fatores de risco para o desenvolvimento e a gravidade da psoríase, ocorrência de artrite psoriásica, idade de manifestação da psoríase e histórico familiar de psoríase, estão representados nas tabelas 6, 7 e 8, respectivamente.

Entre os dados de ocorrência de artrite psoriásica, foram observadas as seguintes associações: com o alelo *\*Del* (OR=2,929;  $p=0,013$ ) e com o genótipo *\*Del\*Del* (OR=4,398;  $p=0,009$ ), para o polimorfismo *InDel14pb* da 3'UTR do *HLA-G*. Segundo Almeida (2012) esses dados indicam que a presença do alelo *\*Del* aumenta as chances de que um paciente com psoríase desenvolva também artrite



psoriásica, sendo esta associação maior quando o alelo *\*Del* encontra-se em homozigose. Embora este polimorfismo ainda não apresente um padrão claro de relação com a expressão da molécula, tem-se descrito que a presença da inserção, devido ao *splicing* alternativo, gera uma molécula menor e, provavelmente, mais estável (DONADI *et al.*, 2011), podendo aumentar a produção de HLA-G. Dessa forma, os sintomas inflamatórios da artrite psoriásica em pacientes com o alelo *\*Del*, podem indicar que os níveis de HLA-G, expressos por esses indivíduos, não são capazes de inibir a ação pró-inflamatória das células do sistema imune.

Nos dados relacionados à idade de manifestação da doença, foi encontrada associação com o alelo *Alu<sub>Y</sub>HG\*In\*Del* (OR=0,418;  $p=0,040$ ). Pouco se pode discutir sobre este resultado visto que ainda não há nenhum trabalho que associe essa *Alu* com doenças, apenas dados populacionais. As relações com histórico familiar de psoríase não apresentaram valores significativos.

**Tabela 5.** Frequências alélicas e genotípicas para casos e controles, cálculos de associação (OR) entre a presença dos polimorfismos e o desenvolvimento da psoríase, valores de intervalo de confiança (IC, 95%) e *p*.

Polimorfismo	Casos	Frequência	Controles	Frequência	OR	IC	<i>p</i>
<b><i>Alu<sub>y</sub>HG</i></b>							
Del	144	0,720	137	0,685	1,182	0,769-1,816	0,444
In	56	0,280	63	0,315	0,845	0,550-1,299	0,444
<b>Total de alelos</b>	<b>200</b>		<b>200</b>				
DelDel	51	0,510	41	0,410	1,497	0,856-2,619	0,156
InDel	42	0,420	55	0,550	0,592	0,338-7,036	0,066
InIn	7	0,070	4	0,040	1,806	0,511-6,375	0,358
<b>Total de indivíduos</b>	<b>100</b>		<b>100</b>				
<b><i>14pb</i></b>							
Del	109	0,545	112	0,560	0,941	0,634-1,395	0,762
In	91	0,455	88	0,440	1,062	0,716-1,576	0,762
<b>Total de alelos</b>	<b>200</b>		<b>200</b>				
DelDel	28	0,280	31	0,310	0,865	0,471-1,590	0,641
InDel	53	0,530	50	0,500	1,127	0,647-1,964	0,671
InIn	19	0,190	19	0,190	1,00	-	-
<b>Total de indivíduos</b>	<b>100</b>		<b>100</b>				

Frequências e associações (GENEPOP e MedCalc); OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; *p*: probabilidade.

**Tabela 6.** Frequências alélicas e genotípicas para a população de casos, cálculos de associação (OR) entre a presença dos polimorfismos e a ocorrência de artrite psoriásica, valores de intervalo de confiança (IC, 95%) e *p*.

Polimorfismo	Com Artrite Psoriásica	Frequência	Sem Artrite Psoriásica	Frequência	OR	IC	<i>p</i>
<b><i>Alu<sub>y</sub>HG</i></b>							
Del	24	0,750	120	0,506	1,200	0,504-2,856	0,680
In	8	0,250	48	0,494	0,833	0,350-1,983	0,680
<b>Total de alelos</b>	<b>32</b>		<b>168</b>				
DelDel	9	0,562	42	0,500	1,285	0,438-3,772	0,647
InDel	6	0,375	36	0,428	0,800	0,266-2,404	0,691
InIn	1	0,062	6	0,071	0,886	0,097-7,728	0,898
<b>Total de indivíduos</b>	<b>16</b>		<b>84</b>				
<b>14pb</b>							
Del	24	0,750	85	0,506	2,929	1,245-6,891	0,013*
In	8	0,250	83	0,494	0,341	0,145-0,803	0,013*
<b>Total de alelos</b>	<b>32</b>		<b>168</b>				
DelDel	9	0,562	19	0,226	4,398	1,446-13,375	0,009*
InDel	6	0,375	47	0,560	0,472	0,157-1,149	0,181
InIn	1	0,063	18	0,214	0,244	0,030-1,976	0,186
<b>Total de indivíduos</b>	<b>16</b>		<b>84</b>				

Frequências e associações (GENEPOP e MedCalc); OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; p: probabilidade.

Os valores significativos estão anotados com \*.

**Tabela 7.** Frequências alélicas e genotípicas para a população de casos, cálculos de associação (OR) entre a presença dos polimorfismos e a idade de manifestação dos primeiros sintomas da psoríase, valores de intervalo de confiança (IC, 95%) e *p*.

Polimorfismo	Até 30 anos	Frequência	< 30 anos	Frequência	OR	IC	<i>p</i>
<b><i>AluyHG</i></b>							
Del	63	0,732	81	0,710	1,115	0,596-2,086	0,731
In	23	0,267	33	0,289	0,896	0,479-1,675	0,731
<b>Total de alelos</b>	<b>86</b>		<b>114</b>				
DelDel	25	0,581	26	0,456	1,656	0,744-3,682	0,216
InDel	13	0,302	29	0,508	0,418	0,182-0,962	0,040*
InIn	5	0,116	2	0,035	3,618	0,666-19,633	0,136
<b>Total de indivíduos</b>	<b>43</b>		<b>57</b>				
<b><i>14pb</i></b>							
Del	43	0,500	65	0,579	0,753	0,429-1,322	0,324
In	43	0,500	49	0,421	1,326	0,756-2,327	0,324
<b>Total de alelos</b>	<b>86</b>		<b>114</b>				
DelDel	12	0,279	16	0,281	0,991	0,410-2,396	0,986
InDel	19	0,442	33	0,579	0,575	0,258-1,280	0,175
InIn	12	0,279	8	0,140	2,371	0,871-6,453	0,091
<b>Total de indivíduos</b>	<b>43</b>		<b>57</b>				

Frequências e associações (GENEPOP e MedCalc); OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; *p*: probabilidade.

Os valores significativos estão anotados com \*.

**Tabela 8.** Frequências alélicas e genotípicas para a população de casos, cálculos de associação (OR) entre a presença dos polimorfismos e o histórico familiar de psoríase, valores de intervalo de confiança (IC, 95%) e *p*.

Polimorfismo	Com Histórico Familiar	Frequência	Sem Histórico Familiar	Frequência	OR	IC	<i>p</i>
<b><i>Alu<sub>y</sub>HG</i></b>							
Del	62	0,704	82	0,732	0,872	0,469-1,622	0,666
In	26	0,295	30	0,267	1,146	0,616-2,131	0,666
<b>Total de alelos</b>	<b>88</b>		<b>112</b>				
DelDel	23	0,522	28	0,500	1,095	0,497-2,413	0,821
InDel	16	0,363	26	0,464	0,659	0,293-1,479	0,312
InIn	5	0,113	2	0,035	3,461	0,638-18,774	0,150
<b>Total de indivíduos</b>	<b>44</b>		<b>56</b>				
<b>14pb</b>							
Del	50	0,568	59	0,527	1,182	0,674-2,072	0,559
In	38	0,432	53	0,473	0,846	0,482-1,483	0,559
<b>Total de alelos</b>	<b>88</b>		<b>112</b>				
DelDel	15	0,341	13	0,232	1,710	0,710-4,122	0,231
InDel	20	0,455	10	0,179	0,580	0,261-1,289	0,181
InIn	9	0,204	33	0,589	1,182	0,434-3,222	0,742
<b>Total de indivíduos</b>	<b>44</b>		<b>56</b>				

Frequências e associações (GENEPOP e MedCalc); OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; *p*: probabilidade.

### 5.3 DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO

O teste de desequilíbrio de ligação entre os dois *loci* (*Alu*yHG e *InDel14pb*) na população total (pacientes mais controles) apresentou um  $p < 0,001$ , indicando que não há a segregação independente entre os dois *loci*, havendo desequilíbrio de ligação. Isto está de acordo com os dados disponíveis na literatura que demonstram forte LD entre os *loci* da região do MHC (DUNN *et al.*, 2005). Determinar regiões do genoma com LD e confirmá-las em diferentes populações é importante para auxiliar na identificação de *loci* marcadores.

### 5.4 INFERÊNCIA DE HAPLÓTIPOS

Devido à presença de desequilíbrio de ligação entre os sítios polimórficos analisados, a inferência de haplótipos foi realizada usando um banco de dados com a genotipagem de 732 amostras, sendo 200 do presente estudo e 532 provenientes do banco de dados do LAPOGE. Os haplótipos observados e as suas frequências, em casos e controles, estão descritos na Tabela 9.

**Tabela 9.** Frequências haplotípicas e de combinações haplotípicas para o grupo de casos e controles.

Haplótipo <i>14pbHLA-G-Alu</i> yG	Psoríase		Controle	
	N	Frequência	n	Frequência
<i>Del-Del</i>	55	0,393	58	0,414
<i>Ins-Ins</i>	3	0,021	13	0,093
<i>Del-Ins</i>	23	0,164	22	0,157
<i>Ins-Del</i>	59	0,421	47	0,336
<b>Total</b>	<b>140</b>	<b>1</b>	<b>140</b>	<b>1</b>
Combinação	n	frequência	n	frequência
<i>Del-Del / Del-Del</i>	9	0,129	9	0,129
<i>Del-Del / Ins-Ins</i>	0	0,000	0	0,000
<i>Del-Del / Del-Ins</i>	13	0,186	19	0,271
<i>Del-Del / Ins-Del</i>	24	0,343	21	0,300
<i>Ins-Ins / Ins-Ins</i>	1	0,014	2	0,029
<i>Ins-Ins / Del-Ins</i>	0	0,000	1	0,014
<i>Ins-Ins / Ins-Del</i>	1	0,014	8	0,114
<i>Del-Ins / Del-Ins</i>	5	0,071	1	0,014
<i>Del-Ins / Ins-Del</i>	0	0,000	0	0,000
<i>Ins-Del / Ins-Del</i>	17	0,243	9	0,129
Haplótipo <i>14pbHLA-G-Alu</i> yG	Psoríase		Controle	
	n	Frequência	n	Frequência
<b>Total</b>	<b>70</b>	<b>1</b>	<b>70</b>	<b>1</b>

Após a inferência restaram 70 indivíduos e 140 haplótipos, tanto para pacientes quanto para controles. O haplótipo mais frequente foi o *14pb\*Ins-AluYHG\*Del*, com frequência de 0,421 em pacientes e 0,336 em casos, e o mais raro *14pb\*Ins-AluYHG\*Ins* com frequência 0,021 em pacientes e 0,093 em controles.

Das dez combinações haplotípicas possíveis, oito foram encontradas entre os controles, sendo que as combinações *14pb\*Del-AluYHG\*Del* / *14pb\*Ins-AluYHG\*Ins* e *14pb\*Del-AluYHG\*Ins* / *14pb\*Ins-AluYHG\*Del* não foram encontradas. Entre os pacientes somente 7 combinações foram observadas, as não encontradas são as duas descritas para controles mais a combinação *14pb\*Ins-AluYHG\*Ins* / *14pb\*Del-AluYHG\*Ins*.

A combinação mais frequente em ambos os grupos foi a *14pb\*Del-AluYHG\*Del* / *14pb\*Ins-AluYHG\*Del* (0,343 em pacientes e 0,300 em controles). Em pacientes as combinações *14pb\*Ins-AluYHG\*Ins* / *14pb\*Ins-AluYHG\*Ins* e *14pb\*Ins/AluYHG\*Ins* + *14pb\*Ins/AluYHG\*Del* foram as menos frequentes, sendo amostradas apenas uma vez (0,014). Em controles as menos frequentes, amostradas uma única vez (0,014) foram *14pb\*Ins-AluYHG\*Ins* / *14pb\*Del-AluYHG\*Ins* e *14pb\*Del-AluYHG\*Ins* / *14pb\*Del-AluYHG\*Ins*.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos dados obtidos entre as possíveis relações da psoríase e os polimorfismos *Alu*yHG e *InDel*14pb do *HLA-G*, pode-se considerar que:

- Em pacientes com sintomas de artrite psoriásica foram observadas associações do alelo \**Del* e do genótipo \**Del*\**Del* do gene *HLA-G*, indicando que este alelo, principalmente em homozigose, apresenta associação positiva com a artrite psoriásica.

- O teste de desequilíbrio de ligação entre os dois *loci* (*Alu*yHG e *InDel*14pb) indicou que não há a segregação independente.

- A presença de associação com o alelo \**Del* indica que estudos mais aprofundados que verifiquem a expressão da molécula devem ser feitos em trabalhos futuros.

- A presença de LD entre esse dois polimorfismos indica que esta região deva ser melhor caracterizada em amostras de estudos caso-controle em diferentes populações. De modo que se possa identificar *loci* marcadores que podem levar a diminuição do esforço e dos custos de genotipagem desta região em estudos de associação com doenças, psoríase ou não, assim como auxiliar no desenvolvimento de técnicas de diagnóstico.



---

REFERÊNCIAS

---

- ALBANESI, C.; SCARPONI C.; GIUSTIZIERI, M. L. *et al.* Keratinocytes in inflammatory skin diseases. **Current Drug Targets – Inflammation & Allergy**, v. 4, reviews p. 329–334, 2005.
- ALMEIDA, B. S. Polimorfismos do gene *HLA-G* em pacientes com psoríase. Florianópolis. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, 2012.
- BACK, L. K. C. Lúpus Eritematoso Sistêmico: Pesquisa de Marcadores Moleculares de Suscetibilidade e Prognóstico. Florianópolis. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2007.
- BATZER, M. A.; DEININGER, P. L.; HELLMANN-BLUMBERG, U.*et al.* Standardized Nomenclature for Alu Repeats. **Journal of Molecular Evolution**, v. 42, p. 3-6, 1996.
- BRITTEN, R. J. Mobile elements inserted in the distant past have taken on important functions. **Gene**, v. 205, p. 177-182, 1997.
- CARDILI, R.; ALVES, T.; FREITAS, J. *et al.* Expression of human leucocyte antigen-G primarily targets affected skin of patients with psoriasis. **The British journal of dermatology**, v. 163, n. 4, p. 769-775, 2010.
- CAROSELLA, E. D.; FAVIER, B.; ROUAS-FREISS, N. *et al.* Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. **Blood** (The American Society of Hematology), v. 111, n. 10, p. 4862-4870, 2008.
- CASTELLI, E.C.; MENDES-JUNIOR, C.T.; VIANNA DE CAMARGO, J.L.*et al.* HLA-G polymorphism and transitional cell carcinoma of the bladder in a Brazilian population, **Tissue Antigens**, v. 72, p. 149-157, 2008.
- CASTELLI, E.; MOREAU, P.; OYA E CHIROMATZO, A.*et al.* In silico analysis of microRNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes. **Human immunology**, v. 70, n. 12, p. 1020-1025, 2009.
- CASTELLI, E.; MENDES-JUNIOR, C.; DEGHAIDE, N. *et al.* The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. **Genes and immunity**, v. 11, n. 2, p. 134-141, 2010.
- CASTELLI, E.; MENDES-JUNIOR, C.; VEIGA-CASTELLI, L.*et al.* A comprehensive study of polymorphic sites along the HLA-G gene:

implication for gene regulation and evolution. **Molecular biology and evolution**, v. 28, n. 11, p. 3069-3086, 2011.

CHAPLIN, D. Overview of the immune response. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 125, n. 2, s. 2, p. S3-23, 2010.

COHEN, S. N.; BARON, S. E.; ARCHER, C. B. Guidance on the diagnosis and clinical management of psoriasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 37, s. 1, p. 13-18, 2012.

COIMBRA, S.; FIGUEIREDO, A.; CASTRO, E.*et al.* The roles of cells and cytokines in the pathogenesis of psoriasis. **International Journal of Dermatology**, v. 51, p. 389-398, 2012.

DAWKINS, R.; LEELAYUWAT, C.; TAY, G.*et al.* Genomics of the major histocompatibility complex: haplotypes, duplication, retroviruses and disease. **Immunological Reviews**, v. 167, p.275-304, 1999.

DEININGER, P. L.; BATZER, M. A. Alu Repeats an Human Disease. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 67, p. 183-193, 1999.

DONADI, E.; CASTELLI, E.; ARNAIZ-VILLENA, A *et al.* Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. **Cellular and molecular life sciences**, v. 68, n. 3, p. 369-395, 2011.

DUFFIN, K. C.; WOODCOCK, J.; KRUEGER, G. G. Genetic variations associated with psoriasis and psoriatic arthritis found by genome-wide association. **Dermatology and Therapy**, v.23.n 2, p.101-113, 2010.

DUNN, D. S.; ROMPHRUK, A. V.; LEELAYUWAT, C *et al.* Polymorphic Alu Insertions and their Associations with MHC Class I Alleles and Haplotypes in the Northeastern Thais. **Annals of Human Genetics**. v. 69, p. 364-372, 2005.

DUNN, D. S.; CHOY, M. K.; PHIPPS, M. E.*et al.* The distribution of major histocompatibility complex class I polymorphic Alu insertions and their associations with HLA alleles in a Chinese population from Malaysia. **Tissue Antigens**, v. 70, p. 136-143, 2007.

ENGLANDER, E. W.; HOWARD, B. H. Nucleosome Positioning by Human Alu Elements in Chromatin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 17, p. 10091-10096, 1995.

ESPOSITO, M.; SARACENO, R.; GIUNTA, A.*et al.* An Italian study on psoriasis and depression. **Dermatology**, v. 212, p. 123–127, 2006.

- GALADARI, I.; SHARIF, M. O.; GALADARI, H. Psoriasis: a fresh look. **Clinics in Dermatology**, v. 23, p. 491-502, 2005.
- GELFAND, J. M.; NEIMANN, A. L.; SHIN, D. B. *et al.* Risk of myocardial infarction in patients with psoriasis. **Journal of the American Medical Association**, v. 296, p. 1735–1741, 2006a.
- GELFAND, J. M.; SHIN, D. B.; NEIMANN, A. L. *et al.* The risk of lymphoma in patients with psoriasis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, p. 2194-2201, 2006b.
- GOLDENSTEIN-SCHAINBERG, C.; FAVARATO, M. H. S.; RANZA, R. Conceitos atuais e relevantes sobre artrite psoriásica. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 52, n. 1, p. 92-106, 2012.
- GONZÁLEZ, S.; QUEIRO, R.; BALLINA, J. Actualización en la patogenia de la artritis psoriásica. **Reumatología Clínica**, v.8, p. S1-S6, 2012.
- GRIFFITHS, C. E. M.; BARKER, J. N. W. N. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. **The Lancet**, v. 370, p. 263-271, 2007.
- GUDJONSSON, J. E.; ELDER, J. T. Psoriasis: epidemiology. **Clinics in Dermatology**, v.25, p. 535-546, 2007.
- HENSELER, T.; CHRISTOPHERS, E. Disease concomitance in psoriasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 32, p. 982–986, 1995.
- HEWAGAMA, A.; RICHARDSON, B. The genetics and epigenetics of autoimmune diseases. **Journal of Autoimmunity**, v. 33, n. 1, p. 1-22, 2009.
- HOUCK, C. M.; RINEHART, F. P.; SCHMID, C. W. A Ubiquitous Family of Repeated DNA Sequences in the Human Genome. **Journal of Molecular Biology**, v.132, p. 289-306, 1979.
- HUEBER, A. J.; McINNES, I. B. Immune regulation in psoriasis and psoriatic arthritis-recent developments. **Immunology letters**, v. 114, n. 2, p. 59-65, 2007.
- JOBIM, M.; JOBIM, L. F.; SALIM, P. H. *et al.* A study of the killer cell immunoglobulin-like receptor gene KIR2DS1 in a Caucasoid Brazilian population with psoriasis vulgaris. **Tissue Antigens**, v.72, n. 4, p. 392-396, 2008.
- KULSKY, J.K; MARTINEZ, P.; LONGMAN-JACOBSEN, N. *et al.* The Association Between HLA-A Alleles and an Alu Dimorphism Near HLA-G, **Journal of Molecular Evolution**, v. 53, p. 114-123, 2001.

KULSKY, J. K.; DUNN, D. S.; HUI, J.*et al.* Alu polymorphism within the MICB gene and association with HLA-B alleles. **Immunogenetics**, v. 53, p. 975-979, 2002.

KULSKY, J. K.; DUNN, D. S. Polymorphic Alu insertions within the Major Histocompatibility Complex class I genomic region: a brief review. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 110, p. 193-202, 2005.

KULSKY, J. K.; GAUDIERI, S.; MARTIN, R. L.*et al.* Coevolution of PERB11 (MIC) and HLA class I genes with HERV-16 and retroelements by extended genomic duplication. **Journal of Molecular Evolution**, v. 49, n. 1, p. 84-97, 1999.

LARSEN, M.; HVIID, T. Human leukocyte antigen-G polymorphism in relation to expression, function, and disease. **Human immunology**, v. 70, n. 12, p. 1026-1034, 2009.

MAK, R. K. H.; HUNDHAUSEN, C.; NESTLE, F. O. Progress in understanding the immunopathogenesis of psoriasis. **Actas Dermosifiliográficas**, v. 100, n. 2, p. 2-13, 2009.

McGREGOR, J. M.; BARKER, J. N.; ROSS, E. L.*et al.* Epidermal dendritic cells in psoriasis possess a phenotype associated with antigen presentation: in situ expression of beta 2-integrins. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 27, p. 383-388, 1992.

MILLER, S.A.; DYKES, D.D; POLESKY, H.F. A Simple Salting Out Procedure for Extraction DNA from Human Nucleated Cell, **Nucleic Acids Research**, v. 16:1215, 1988.

MONTELEONE, G.; PALLONE, F.; MACDONALD, T. T.*et al.* Psoriasis: from pathogenesis to novel therapeutic approaches. **Clinical science**, v. 120, n. 1, p. 1-11, 2011.

MOREAU, P.; FLAJOLLET, S.; CAROSELLA, E. Non-classical transcriptional regulation of HLA-G: an update. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 13, n. 9B, p. 2973-2989, 2009.

NEEFJES, J.; JONGSMA, M.; PAUL, P. *et al.* Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 12, p. 823-36, 2011.

NEIMANN, A. L.; SHIN, D. B.; WANG, X.*et al.* Prevalence of cardiovascular risk factors in patients with psoriasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 55, p. 829-835, 2006.

NOGRALES, K. E.; DAVIDOVICI, B.; KRUEGER, J. G. New insights in the immunologic basis of psoriasis. **Seminars in cutaneous medicine and surgery**, v. 29, n. 1, p. 3-9, 2010.

NOVICK, G. E.; BATZER, M. A.; DEININGER, P. L.*et al.* The Mobile Genetic Element Alu in the Human Genome. **BioScience**, v. 46, n. 1, p. 32-34, 1996.

NÜCKEL, H.; CASTELLI, E. C.; MOREAU, P.*et al.* Simple Methods for the Detection of HLA-G Variants in Coding and Non-coding Regions. **Immunogenetics: Methods and Applications in Clinical Practice, Methods in Molecular Biology**, v. 882, p.127-142, 2012.

RAYCHAUDHURI, S. P.; FARBER, E. M. The prevalence of psoriasis in the world. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 15, p. 16-17, 2001.

RAYMOND, M; ROUSSET, F. GENEPOP: population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, v.86, p.248-249, 1995.

RELLE, M.; SCHWARTING, A. Role of MHC-Linked Susceptibility Genes in the Pathogenesis of Human and Murine Lupus. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p., 2012.

ROWOLD, D. J.; HERRERA, R. J. Alu elements and the human genome. **Genetica**, v. 108, p. 57-72, 2000.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA (SBD). Consenso Brasileiro de Psoríase. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2009. 116 p.

STEPHENS, M; SMITH, NJ; DONNELLY, P.A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. **The American Journal of Human Genetic**.v.8, n. 4, p. 978-89, 2001.

STICHERLING, M. Mechanisms of psoriasis. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 2, n. 2, p. 275-281, 2005.

UROSEVIC, M. HLA-G in the skin--friend or foe? **Seminars in cancer biology**, v. 17, n. 6, p. 480-484, 2007.

WETZEL A.; WETZIG T.; HAUSTEIN, U. F.*et al.* A. Increased neutrophil adherence in psoriasis: role of the human endothelial cell receptor Thy-1 (CD90). **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, p. 441-452, 2006.

---

WOJAS-PELC, A. W.; MARCINKIEWICZ, J. What is the role of oxygenase-1 in psoriasis? Current concepts of pathogenesis. **International Journal of Experimental Pathology**, n. 88, p. 95-102, 2007.

WOOLF, B. On estimating the relation between blood group and disease. **Annual Human Genetics**, Cambridge, v.19, p.251-253, 1955.

ZIETKIEWICZ, E.; RICHER, C.; MAKALOWSKI, W.*et al.* A young Alu subfamily amplified independently in human and African great apes lineages. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 25, p.5608-5612, 1994.

**ANEXO A – Questionário pacientes com psoríase**

Universidade Federal de Santa Catarina  
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética/CCB  
Ambulatório de Dermatologia/Psoríase – Hospital Nereu Ramos  
Estudo Genético e Epidemiológico em Pacientes com Psoríase no  
Estado de Santa Catarina

**QUESTIONÁRIO  
PACIENTES COM PSORÍASE****DADOS PESSOAIS**

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ anos SEXO: ( ) F ( ) M Ocupação: \_\_\_\_\_

Cidade onde mora: \_\_\_\_\_ Natural de: \_\_\_\_\_

Telefone para Contato: \_\_\_\_\_

Cor da Pele: ( ) B ( ) N ( ) M ( ) P ( ) A

**DADOS FAMILIARES**

Nome do pai: \_\_\_\_\_

Cidade onde nasceu: \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_

Ascendência: Materna \_\_\_\_\_ Paterna \_\_\_\_\_

Nome da mãe: \_\_\_\_\_

Cidade onde nasceu: \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_

Ascendência: Materna \_\_\_\_\_ Paterna \_\_\_\_\_

**HISTÓRICO DA DOENÇA**

Tempo de doença diagnosticada: \_\_\_\_\_

Fator desencadeante: \_\_\_\_\_

Local que surgiram as primeiras lesões: \_\_\_\_\_

Classificação da doença na consulta:

( ) ausente ( ) leve ( ) moderada ( ) grave ( ) muito grave

Classificação PASI: \_\_\_\_\_

Padrão Morfológico:

( ) Vulgar ( ) Gutata ( ) Pustulosa ( ) Eritrodérmica

( ) Palmoplantar ( ) Invertida

\_\_\_\_\_  
Tratamento Atual:

**HISTÓRICO DE DOENÇAS PESSOAIS E/OU NA FAMÍLIA****Psoríase**( )S ( )N Parentesco: \_\_\_\_\_**Doença de Crohn**( )S ( )N**Artrite**( )S ( )N**DM**( )S ( )N**HAS**( )S ( )N**Dislipidemia**( )S ( )N**Depressão**( )S ( )N**Hepatite**( )S ( )N**HIV**( )S ( )N**Dermatite Tópica**( )S ( )N**Dermatite de Contato**( )S ( )N**Outras**( )S ( )N Quais? \_\_\_\_\_**Observações:** \_\_\_\_\_**HÁBITOS**

Álcool: ( )S ( )N Frequência \_\_\_\_\_

Cigarro: ( )S ( )N Cigarros/dia: \_\_\_\_\_ Já fumou? ( )S ( )N

Drogas Ilícitas: ( )S ( )N Já usou? ( )S ( )N Qual? \_\_\_\_\_

**Observações:** \_\_\_\_\_**OUTRAS INFORMAÇÕES****TTT Medicamentoso Antes do Diagnóstico:** ( )S ( )N

Quais? \_\_\_\_\_

**TTT Hormonal Antes do Diagnóstico:** ( )S ( )N

Qual? ( )AC ( ) Outro \_\_\_\_\_

**Idade da Menarca:** \_\_\_\_\_ anos **Menopausa:** ( )S ( )N **Idade:** \_\_\_\_\_ anos**Nº de Gestações:** \_\_\_\_\_ **Nº de Filhos:** \_\_\_\_\_**PAINEL LABORATORIAL**

Hemograma c/ plaquetas: \_\_\_\_\_ -

ALT/AST: \_\_\_\_\_  $\gamma$ GT: \_\_\_\_\_ Fosfatase Alcalina: \_\_\_\_\_ Uréia: \_\_\_\_\_

Creatinina: \_\_\_\_\_ Ácido Úrico: \_\_\_\_\_ Colesterol Total: \_\_\_\_\_

HDL: \_\_\_\_\_ Triglicerídeos: \_\_\_\_\_ Glicose: \_\_\_\_\_ VHS: \_\_\_\_\_

Na, K, Ca, Mg: \_\_\_\_\_ Proteína C Reativa: \_\_\_\_\_

ASLO: \_\_\_\_\_ HBSAg: \_\_\_\_\_ Anti-HBS: \_\_\_\_\_ Anti-HCV: \_\_\_\_\_

Anti-HIV 1e 2: \_\_\_\_\_ FAN: \_\_\_\_\_ IgE total: \_\_\_\_\_

**Observações:** \_\_\_\_\_



**ANEXO B – Questionário indivíduos-controles**

**Universidade Federal de Santa Catarina**  
**Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética/CCB**  
**Laboratório de Polimorfismos Genéticos**

**QUESTIONÁRIO  
INDIVÍDUOS-CONTROLES****Dados Pessoais:****Data:** \_\_/\_\_/\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ Telefone Residencial: \_\_\_\_\_

Telefone Trabalho: \_\_\_\_\_ Celular: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: ( ) M ( ) F Data de nascimento: \_\_\_\_\_

Estado Civil: \_\_\_\_\_ Tipo de sangue: \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_ Aposentado: ( ) Sim ( ) Não

Escolaridade:

( ) analfabeto ( ) 1º grau incompleto ( ) 1º grau completo

( ) 2º grau incompleto ( ) 2º grau completo ( ) superior incompleto

( ) superior completo ( ) pós graduação

Peso: \_\_\_\_\_ Altura: \_\_\_\_\_

Cidade onde nasceu: \_\_\_\_\_

Ascendência: Materna \_\_\_\_\_ Paterna \_\_\_\_\_

Etnia: ( ) Euro descendente ( ) Afro descendente ( ) Asiático descendente

( ) Indígena descendente

Cor da pele: ( ) negra ( ) mulata ( ) amarela ( ) branca

Observações: \_\_\_\_\_

**Dados Familiares:**

Nome do pai: \_\_\_\_\_

Cidade onde nasceu: \_\_\_\_\_

Descendência do pai: Materna \_\_\_\_\_ Paterna \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_

Nome da mãe: \_\_\_\_\_

Cidade onde nasceu: \_\_\_\_\_

Descendência da mãe: Materna \_\_\_\_\_ Paterna \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_

Possui Irmãos: ( ) Sim ( ) Não Quantos: \_\_\_\_\_

Possui filhos: ( ) Sim ( ) Não Quantos: \_\_\_\_\_

Ingere **BEBIDA ALCOÓLICA**? ( ) Sim ( ) Não

Frequência: ( ) Todos os dias ( ) Fim de semana ( ) Esporadicamente

Quantidade (copos 200ml): \_\_\_\_\_

Que tipo de bebida alcoólica ingere mais frequentemente?

( ) Cerveja ( ) Vinho ( ) Cachaça ( ) Outro \_\_\_\_\_

Que tipo de bebida alcoólica nunca ingere?

( ) Cerveja ( ) Vinho ( ) Cachaça ( ) Outro \_\_\_\_\_

Pratica **EXERCÍCIOS FÍSICOS**? ( ) Sim ( ) Não Tipo: \_\_\_\_\_

Quantidade: ( ) menos de 30 min ( ) 30 min ( ) 1h ( ) mais de 1 h

Frequência: ( ) 1x semana ( ) 2-3x semana ( ) 4-6x semana ( ) Todos os dias ( ) Menos de 1x semana

Você **FUMA**? ( ) Sim ( ) Não Você já **FUMOU**? ( ) Sim ( ) Não

Tipo: ( ) Cigarro ( ) Charuto ( ) Cachimbo ( ) Outro \_\_\_\_\_

Quantidade e Frequência (nº de cigarros por dia): \_\_\_\_\_

Tempo que fuma ou fumou: \_\_\_\_\_

Há quanto tempo parou: \_\_\_\_\_

### **Histórico Hormonal e Reprodutivo**

Idade da MENARCA: \_\_\_\_\_

MENOPAUSA: ( ) Sim ( ) Não Idade: \_\_\_\_\_

HISTERECTOMIA: ( ) Sim ( ) Não

PARIDADE:

Nº de gestações \_\_\_\_\_ Idade da 1ª gestação \_\_\_\_\_

Nº de filhos ( ) nulípara N: \_\_\_\_\_

Abortos ( ) P ( ) E N: \_\_\_\_\_

Amamentou: ( ) Sim ( ) Não Tempo total (meses): \_\_\_\_\_

TRAT. HORMONAL:

Utiliza AC? ( ) Sim ( ) Não Já utilizou AC? ( ) Sim ( ) Não

Nome e tipo (oral, adesivo, injetável) do AC: \_\_\_\_\_

Tempo que usa ou usou AC: \_\_\_\_\_

Há quanto tempo parou? \_\_\_\_\_

Faz TRH? ( ) Sim ( ) Não Já fez TRH? ( ) Sim ( ) Não

Nome do Hormônio: \_\_\_\_\_

Tempo que faz ou fez TRH: \_\_\_\_\_

Há quanto tempo parou? \_\_\_\_\_

( ) Outros hormônios \_\_\_\_\_ Tempo total: \_\_\_\_\_

Observações \_\_\_\_\_

### Histórico Médico

Caso de **CÂNCER** pessoal? ( ) Sim ( ) Não

Tipo: \_\_\_\_\_

Casos de **CÂNCER DE MAMA** na família? ( ) Sim ( ) Não

Grau de Parentesco: ( ) filha ( ) irmã ( ) mãe ( ) avó

( ) tia materna 1º grau ( ) tia paterna 1º grau ( ) prima

materna 1º grau ( ) prima paterna 1º grau

( ) Outros \_\_\_\_\_

Casos de **CÂNCER** de outro tipo na família? ( ) Sim ( ) Não

Grau de Parentesco e tipo: \_\_\_\_\_

Caso de **TUMOR BENIGNO** pessoal? ( ) Sim ( ) Não

Local: \_\_\_\_\_

Caso de **DOENÇA AUTOIMUNE** pessoal? ( ) Sim ( ) Não

Qual? \_\_\_\_\_

Tempo de diagnóstico: \_\_\_\_\_

Casos de **DOENÇA AUTOIMUNE** na família? ( ) Sim ( ) Não

Grau de Parentesco e tipo: \_\_\_\_\_

Você tem alguma **DOENÇA CARDIOVASCULAR**? ( ) Sim ( ) Não

Qual? (s) \_\_\_\_\_

HIPERTENSÃO ARTERIAL: ( ) Sim ( ) Não ASMA: ( ) Sim ( ) Não

HIPERCOLESTEROLEMIA: ( ) Sim ( ) Não DENGUE: ( ) Sim ( ) Não

OSTEOPOROSE: ( ) Sim ( ) Não TUBERCULOSE: ( ) Sim ( ) Não

DOENÇA REUMÁTICA: ( ) Sim ( ) Não DIABETES: ( ) Sim ( ) Não

HIV: ( ) Sim ( ) Não ( ) Nunca fez exame

HEPATITE: ( ) Sim ( ) Não ( ) Nunca fez exame

DISTÚRPIO RENAL: ( ) Sim ( ) Não

---

DISTÚRBIO PULMONAR:( )Sim ( )Não

DISTÚRBIO HEPÁTICO:( )Sim ( )Não

Casos de DOENÇA DE ALZHEIMER na família: ( )Sim ( ) Não

Grau de parentesco: \_\_\_\_\_

Casos de DOENÇA DE PARKINSON na família: ( )Sim ( ) Não

Grau de parentesco: \_\_\_\_\_

OUTRAS DOENÇAS?: \_\_\_\_\_

Alérgico a algum medicamento? \_\_\_\_\_

Alérgico a algum alimento? \_\_\_\_\_

Teve DEPRESSÃO? \_\_\_\_\_

Utilizou ou utiliza alguma medicação por longo tempo? ( ) Sim ( ) Não

Nome do medicamento (dosagem e frequência) e tempo que utilizou:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**ANEXO C – Termo de consentimento livre esclarecido**

**Universidade Federal de Santa Catarina  
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética/CCB  
Ambulatório de Dermatologia/Psoríase – Hospital Nereu Ramos  
Estudo Genético e Epidemiológico em Pacientes com Psoríase no  
Estado de Santa Catarina**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****PACIENTES COM PSORÍASE**

**Projeto de Pesquisa:** “Estudo genético e epidemiológico em pacientes com psoríase no estado de Santa Catarina”.

Informações: Pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina estão desenvolvendo um projeto de pesquisa para avaliação de fatores genéticos, doenças e hábitos alimentares e pessoais que podem estar associados com a psoríase. Para isto pedimos sua permissão para coletarmos uma amostra de sangue sua (cerca de 10 ml) e colaboração para responder um questionário que dura aproximadamente quinze minutos. Com essa amostra, nós iremos extrair uma quantia pequena de DNA (molécula que contém os genes, que são as informações de suas características biológicas). O DNA será analisado no laboratório para tentarmos descobrir se há relação entre alguns de seus genes, propostos no atual projeto (genes relacionados a células de defesa do organismo) e esta doença. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em possíveis futuros projetos que envolvam testes genéticos, aprovados pelo sistema CEP/CONEP, desde que receba novamente sua autorização, após um novo contato. Deixamos claro que sua participação é voluntária, não influenciando no seu atendimento e tratamento. A equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à sua disposição para responder qualquer pergunta que você queira fazer, e esclarecer quaisquer dúvidas que porventura apareçam. Para isso você pode telefonar para o número (48) 3721-9804 e conversar com a Prof<sup>ª</sup> Dra. Ilíada Rainha de Souza ou com qualquer outro participante do estudo.

**Riscos:** A coleta de sangue é um procedimento normal para o tratamento da sua doença. O aparecimento de mancha roxa ou dor no

local da espetada da agulha podem ocorrer sem representar maiores preocupações. As informações coletadas e os resultados das análises genéticas serão mantidos em sigilo e serão utilizados somente pela equipe da pesquisa.

**Custos:** Como já dissemos a sua participação nessa pesquisa é voluntária, não havendo, portanto, nem custos nem pagamento para isso.

**Benefícios:** Você não terá nenhum benefício direto ao participar desta pesquisa, mas os resultados deste estudo poderão no futuro proporcionar novas alternativas para tratamento dessa doença, bem como para identificação de pessoas que tem risco de desenvolvê-la.

**Desistência:** Caso você desista de participar desse estudo, mesmo já tendo assinado esse termo, você só precisa entrar em contato com a equipe realizadora, através do telefone (48) 3721 9804, e informar a sua desistência. Nenhum tipo de penalidade lhe será aplicada.

## DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu, \_\_\_\_\_, fui esclarecido (a) sobre a pesquisa “**Estudo genético e epidemiológico em pacientes com psoríase no estado de Santa Catarina**”, e concordo que meus dados sejam utilizados na realização da mesma e autorizo a guarda de meu material biológico para o caso de futuras pesquisas, sendo eu contatado (a) para fornecer nova autorização caso forem realizadas novas pesquisas não mencionadas neste projeto.

Florianópolis, \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

**ANEXO D – Termo de consentimento livre esclarecido indivíduos-controles**

Universidade Federal de Santa Catarina  
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética/CCB  
Laboratório de Polimorfismos Genéticos

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****INDIVÍDUOS-CONTROLES**

**Projetos de Pesquisa:** “Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina”, “Genética da autoimunidade: polimorfismos em Lúpus Eritematoso Sistêmico e Artrite Reumatóide em pacientes de Santa Catarina” e “Estudo Genético e Epidemiológico em Pacientes com Psoríase no Estado de Santa Catarina”.

**Informações:** Pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina estão desenvolvendo projetos de pesquisa para avaliação de fatores genéticos, doenças e hábitos alimentares e pessoais que podem estar associados ao **aparecimento do câncer de mama e doenças autoimunes**. Para isto pedimos sua **colaboração e permissão** para fazer parte do **grupo controle** e para extrairmos de parte de seu material biológico, uma quantia pequena de **DNA** (molécula que contém os genes, que são as informações de suas características biológicas). O DNA será analisado no laboratório para tentarmos descobrir se há relação entre alguns genes, propostos nos atuais projetos (ligados ao metabolismo de hormônios sexuais, de substâncias estranhas ao organismo, relacionados ao reparo de DNA e sistema imune) e o aparecimento destas doenças. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em possíveis futuros projetos que envolvam testes genéticos, aprovados pelo sistema CEP/CONEP, desde que receba novamente sua autorização, após um novo contato. Deixamos claro que **sua participação é voluntária**. A equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à sua disposição para responder qualquer pergunta que você queira fazer, e esclarecer quaisquer dúvidas que porventura apareçam. Para isso você pode telefonar para o número **(48)**

**3721-9804** e conversar com a Profa. Dra. Ilíada Rainha de Souza ou seus orientandos.

**Procedimentos:** Caso você concorde em participar, você irá preencher um questionário para sabermos seus dados pessoais (como nome, endereço e telefone) e irá assinar um termo de consentimento livre e esclarecido para que possamos utilizar seus dados pessoais e material biológico nestas pesquisas. Também precisaremos tirar um pouco de sangue numa seringa. O DNA extraído das amostras coletadas será guardado no Laboratório sob responsabilidade da coordenadora do projeto. Entraremos em contato pelo telefone fornecido o mais breve possível para realizarmos um novo questionário de duração máxima de 20 minutos. Este questionário conterá dados como seus hábitos alimentares e pessoais, histórico reprodutivo e histórico clínico, essenciais para o desenvolvimento das pesquisas.

**Riscos:** A coleta de sangue é um procedimento normal para a realização de vários exames. O aparecimento de mancha roxa ou dor no local da espetada da agulha podem ocorrer sem representar maiores preocupações. As informações coletadas, bem como os resultados das análises genéticas serão mantidas em sigilo e serão utilizadas somente pela equipe da pesquisa.

**Custos:** Você não precisará pagar nada para fazer parte deste estudo.

**Benefícios:** Você não terá nenhum benefício direto ao participar desta pesquisa, mas os resultados deste estudo poderão no futuro proporcionar novas alternativas para prevenção do câncer de mama e doenças autoimunes, e para identificação de pessoas que tem risco de desenvolver essas doenças, podendo beneficiar muitas outras pessoas.

### Assinaturas

**Pesquisador responsável** \_\_\_\_\_

Florianópolis, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

---



**DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO**

Eu, \_\_\_\_\_, fui esclarecido(a) sobre as pesquisas “Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina”, “Genética da autoimunidade: polimorfismos em lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide em pacientes de Santa Catarina” e “Estudo Genético e Epidemiológico em Pacientes com Psoríase no Estado de Santa Catarina” e concordo que meus dados sejam utilizados na realização das mesmas.

Florianópolis, \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_